

TESE DE DOUTORAMENTO

**DESARROLLO DE FILMS
OBTENIDOS CON
HIDROCOLOIDES MODIFICADOS
POR NANOARCILLA Y
RADIACIÓN ULTRAVIOLETA**

Davinia Candia Balseiro

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL. CAMPUS TERRA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INNOVACION EN SEGURIDADE E TECNOLOXÍA
ALIMENTARIAS

LUGO

2018



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Desarrollo de films obtenidos con hidrocoloides modificados por
nanoarcilla y radiación ultravioleta

Dna. **Davinia Candia Balseiro**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Lugo, 7 de xuño de 2018

Asdo. Davinia Candia Balseiro



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Desarrollo de films obtenidos con hidrocoloides modificados por nanoarcilla y radiación ultravioleta

D. **Ángel Cobos García**, Catedrático de Universidade do Departamento de Química Analítica,
Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela, e
Dña. **Olga Díaz Rubio**, Profesora Titular de Universidade do Departamento de Química Analítica,
Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dña. **Davinia Candía Balseiro**, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directores desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

De acordo co artigo 41 do Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de COMPENDIO DE PUBLICACIÓNS, nos que a participación da doutoranda foi decisiva para a súa elaboración.

A utilización destes artigos nesta memoria, está en coñecemento dos coautores, tanto doutores como non doutores. Ademais, estes últimos teñen coñecemento de que ningún dos traballos aquí reunidos poderá ser presentado en ningunha outra tese de doutoramento.

En Lugo, 7 de xuño de 2018

Asdo. Ángel Cobos García

Asdo. Olga Díaz Rubio



Agradecimientos

*A mi directora **Olga Díaz Rubio**, por introducirme en el mundo de la investigación y por darme la oportunidad de aprender junto a ella. A mi director **Ángel Cobos García**, por su paciencia infinita, por su comprensión y por todos los conocimientos que me ha transmitido. Sin vuestra ayuda no lo habría conseguido y os estaré eternamente agradecida.*

*A mi marido **Félix**, por estar siempre a mi lado, a pesar de todo el tiempo que le he robado.*

*A mi **familia**, por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos y por escucharme tantas veces, como lo he necesitado.*

*A la **vida**, porque todo depende de dónde, cómo y cuándo.*

*Al **destino** que me ha hecho encontrarme con personas maravillosas, tanto en el ámbito profesional como en el personal.*

*A **Suiza**, mi país de acogida, por la oportunidad que me ha ofrecido para desarrollarme en el ámbito profesional. Y gracias al cual he podido compatibilizar mi trabajo con la realización de este gran proyecto.*

*A **Javiera Rubilar Parra**, por su generosidad, su positividad y por dejarme formar parte de su proyecto de investigación.*

*A la **Universidad de Santiago de Compostela**, por darme la oportunidad de formarme rodeada de los mejores profesionales.*

Este trabajo de investigación ha sido financiado por la Xunta de Galicia, Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, a través de una Axuda do Programa de Consolidación e Estruturación de Unidades de Investigación Competitivas, modalidad de Grupos de Potencial Crecemento (GPC), referencia ED431B 2016/008, y desarrollado en la Facultad de Ciencias de Lugo, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela.



ÍNDICE

RESUMEN/RESUMO/SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. HIDROCOLOIDES	11
1.2. ENVASES DE HIDROCOLOIDES: CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES	12
1.3. HIDROCOLOIDES EMPLEADOS PARA LA ELABORACIÓN DE FILMS	16
1.3.1. Polisacáridos	16
1.3.1.1. <i>Quitosano</i>	17
1.3.2. Proteínas	20
1.3.2.1. <i>Proteínas de lactosuero</i>	22
1.4. OTROS COMPONENTES	26
1.4.1. Plastificantes	27
1.4.2. Lípidos	28
1.4.3. Nanopartículas	29
1.4.4. Antimicrobianos	36
1.5. FILMS DE QUITOSANO	39
1.6. FILMS DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO	41
1.7. APLICACIÓN DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN LA ELABORACIÓN DE FILMS	45

1.8. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y ESTRUCTURA DE LA TESIS	51
2. OBJETIVOS	53
3. PUBLICACIONES	57
4. DISCUSIÓN GENERAL	65
4.1. PELÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO MODIFICADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y ALCALINIZACIÓN	69
4.2. RESULTADOS A PARTIR DE PELÍCULAS REALIZADAS CON QUITOSANO	83
4.2.1. Efecto del tratamiento con radiación ultravioleta en las propiedades de las películas de quitosano	85
4.2.2. Efecto de la adición de nanoarcilla y de LAE en las propiedades físico-mecánicas de las películas de quitosano	88
5. CONCLUSIONES	93
6. BIBLIOGRAFÍA	97



RESUMEN

RESUMO

SUMMARY



RESUMEN

Los problemas medioambientales generados por la excesiva utilización de envases para alimentos derivados del petróleo hacen que se plantee la necesidad de buscar nuevos materiales de envasado respetuosos con el medio ambiente, en particular aquellos biodegradables, comestibles o no. Los hidrocoloides son biodegradables y pueden utilizarse para elaborar películas o films con buenas propiedades para el envasado de alimentos. En este estudio se han empleado dos tipos de hidrocoloides: las proteínas del lactosuero y el quitosano. También tienen el interés de que se obtienen de subproductos de la industria alimentaria.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el desarrollo de films basados en proteínas de lactosuero o quitosano empleando tecnologías novedosas como la radiación ultravioleta (combinada o no con la modificación del pH) o la adición de una nanoarcilla y un antimicrobiano con la finalidad de mejorar sus propiedades y así ser candidatos a sustituir, al menos en parte, a los materiales de envasado convencionales derivados del petróleo. Para ello se evaluaron diferentes características de los films como las propiedades mecánicas, la permeabilidad al vapor de agua, la solubilidad, el color y la microestructura.

En primer lugar se abordó la mejora de las películas comestibles de proteínas de lactosuero mediante la aplicación de la radiación ultravioleta en diferentes dosis y momentos de aplicación (sobre la solución proteica a pH 7 o sobre films formados previamente). Se observó que, para que se produzca una mejora significativa, tiene que ser aplicada en la solución proteica, no en los films preformados, y al menos a una dosis de 12 J cm^{-2} . Con este tratamiento se produjeron cambios estructurales en las proteínas y mejoraron las propiedades mecánicas de los films. Además se observó un descenso de la solubilidad y una modificación importante del color de las películas.

También se estudió la combinación de radiación ultravioleta con la alcalinización de las soluciones formadoras de los films, observándose interacciones entre ambos factores. El tratamiento ultravioleta produjo mejoras más importantes en las propiedades mecánicas de los films cuando se aplicó en las soluciones a pH 9. De estos estudios se concluyó que la aplicación de radiación ultravioleta o la combinación de dicho tratamiento con alcalinización puede ser útil para obtener films de concentrados de proteínas de lactosuero con propiedades adecuadas para el envasado de alimentos.

También se trató de mejorar las películas de quitosano a través de la aplicación de distintas dosis de radiación ultravioleta, o la incorporación de un antimicrobiano [LAE (etil lauroil arginato)] y de una nanoarcilla (Cloisita 30B). El tratamiento con radiación ultravioleta, en las condiciones en las que se aplicó, no aportó mejoras significativas a las propiedades de los films de quitosano. Sin embargo, la adición del antimicrobiano y/o la nanoarcilla sí mejoraron las propiedades mecánicas de los films, observándose interacción entre ambos compuestos e influencia de la concentración añadida de cada uno de ellos. Los films a los que se les añadieron las máximas concentraciones estudiadas (1g/L de LAE y/o 10 g/L de nanoarcilla) mostraron las mejores propiedades mecánicas. La adición de nanoarcilla a esa concentración aumentó la opacidad de las películas y, por lo tanto, su potencial utilidad para proteger los alimentos de la luz.

Palabras clave: envases comestibles, envases biodegradables, proteínas de lactosuero, quitosano, radiación ultravioleta, nanoarcilla, antimicrobiano

RESUMO

Os problemas medioambientais xerados pola excesiva utilización de envases para alimentos derivados do petróleo fan que se expoña a necesidade de buscar novos materiais de envasado respectuosos co medio ambiente, en particular aqueles biodegradables, comestibles ou non. Os hidrocoloides son biodegradables e poden utilizarse para elaborar películas ou filmes con boas propiedades para o envasado de alimentos. Neste estudo empregáronse dous tipos de hidrocoloides: as proteínas do lactosoro e o quitosano. Tamén teñen o interese de que se obteñen de subprodutos da industria alimentaria.

O obxectivo principal desta Tese Doutoral foi o desenvolvemento de filmes baseados en proteínas de lactosoro ou quitosano empregando tecnoloxías novas como a radiación ultravioleta (combinada ou non coa modificación do pH) ou a adición de unha nanoarxila e un antimicrobiano coa finalidade de mellorar as súas propiedades e así ser candidatos a substituír, polo menos en parte, aos materiais de envasado convencionais derivados do petróleo. Para iso avaliáronse diferentes características dos filmes como as propiedades mecánicas, a permeabilidade ao vapor de auga, a solubilidade, a cor e a microestrutura).

En primeiro lugar abordouse a mellora das películas comestibles de proteínas de lactosoro mediante a aplicación da radiación ultravioleta en diferentes doses e momentos de aplicación (sobre a solución proteica a pH 7 ou sobre filmes formados previamente). Observouse que para que se produza unha mellora significativa ten que ser aplicada na solución proteica, non nos filmes preformados, e polo menos a unha dose de 12 J cm^{-2} . Con este tratamento prodúcense cambios estruturais nas proteínas e melloran as propiedades mecánicas dos filmes. Ademais observouse un descenso da solubilidade e unha modificación importante da cor das películas. Tamén se estudou a combinación de radiación ultravioleta coa

alcalinización das solucións formadoras dos filmes, observándose interaccións entre ambos os factores. O tratamento ultravioleta produciu melloras máis importantes nas propiedades mecánicas dos filmes cando se aplicou nas solucións a pH 9. Destes estudos concluíuse que a aplicación de radiación ultravioleta ou a combinación do devandito tratamento con alcalinización pode ser útil para obter filmes de concentrados de proteínas de lactosoro con propiedades adecuadas para o envasado de alimentos.

Tamén tratouse de mellorar as películas de quitosano a través da aplicación de distintas doses de radiación ultravioleta, ou a incorporación dun antimicrobiano [LAE (etil lauroil arginato)] e dunha nanoarxila (Cloisita 30B). O tratamento con radiación ultravioleta nas condicións nas que se aplicou, non achegou melloras significativas ás propiedades dos filmes de quitosano. Con todo, a adición do antimicrobiano e/ou a nanoarxila si melloraron as propiedades mecánicas dos filmes, observándose interacción entre ambos os compostos e influencia da concentración engadida de cada un deles. Os filmes aos que se lles engadiron as máximas concentracións estudadas (1 g/ L de LAE e/ou 10 g/ L de nanoarxila) mostraron as mellores propiedades mecánicas. A adición de nanoarxila a esa concentración aumentou a opacidade das películas e, por tanto, a súa potencial utilidade para protexer os alimentos da luz.

Palabras clave: envases comestibles, envases biodegradables, proteínas de lactosoro, quitosano, radiación ultravioleta, nanoarxila, antimicrobiano

SUMMARY

The environmental problems caused by the excessive use of petroleum-based materials as food packaging materials increase the need to develop environmental-friendly new packaging materials, in particular, those biodegradable, edible or not. Hydrocolloids are biodegradable and can be used to produce films with good properties for food packaging. In this study, two types of hydrocolloids have been used: whey proteins and chitosan. They are also interesting because they are obtained from by-products of the food industry.

The main objective of this Doctoral Thesis was the development of whey proteins or chitosan films using innovative technologies such as ultraviolet radiation (combined or not with the change in pH) or the addition of a nanoclay and an antimicrobial with the purpose of improve its properties and so, to be candidates to replace, at least in part, petroleum-based packaging materials. In order to get this objective, different film characteristics such as mechanical properties, water vapor permeability, solubility, color and microstructure were evaluated.

Firstly, the improvement of whey proteins edible films using the application of ultraviolet radiation at different doses and application moment (to film-forming solution at pH 7 or to preformed films) was evaluated. Significant improvement in properties of films could be observed by ultraviolet radiation only when this treatment was applied to film-forming solutions and at least at a dose of 12 J cm^{-2} . With this treatment, structural changes in proteins were produced and the mechanical properties of the films were improved. Besides, a decrease in the solubility and a substantial modification of the color of the films were observed. The combination of ultraviolet radiation with alkalisation of film forming solutions was also studied, observing interactions between both factors. Ultraviolet treatment produced

major improvements in the mechanical properties of the films when applied to solutions at pH 9. It is concluded that the application of ultraviolet radiation or a combination of treatment with alkalisiation may be useful for whey protein concentrate films with properties suitable for food packaging.

It was also studied the improvement of chitosan films through the application of different doses of ultraviolet radiation, or the incorporation of an antimicrobial agent [LAE (ethyl lauroyl arginate)] and a nanoclay (Cloisite 30B). Ultraviolet radiation, in the conditions in which it was applied, did not provide significant improvements to the properties of chitosan films.

However, the addition of the antimicrobial and/or the nanoclay improved the mechanical properties of the films; interaction between both compounds and influence of the added concentration were observed. The films obtained with the highest concentrations of LAE (1 g/L) or nanoclay (10 g/L) showed the best mechanical properties. The addition of this nanoclay concentration increased the opacity of the films which it is of potential utility for the light protection of food.

Key words: edible packaging, biodegradable packaging, whey proteins, chitosan, ultraviolet radiation, nanoclay, antimicrobial compound



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. HIDROCOLOIDES

El término “hidrocoloides” se emplea para describir un amplio número de polisacáridos y proteínas que se utilizan en muchos sectores industriales con muy variadas funciones (espesantes, gelificantes, estabilizantes de emulsiones y espumas, liberación controlada de sabores, etc.). Muchos de ellos se utilizan cada vez más en la industria alimentaria con estos fines, influyendo en las características organolépticas y en la textura de los alimentos aunque se añadan en concentraciones bajas, normalmente menos del 1% (Williams y Phillips, 2009).

Los polisacáridos que se emplean comercialmente tienen un origen muy variado; pueden así proceder de árboles (celulosa), exudados de árboles (como la goma arábica), plantas (almidones, pectinas, celulosa), semillas (como la goma guar), algas (carragenatos, alginatos, agar), de fermentación microbiana (goma xantana, goma gelana) o de origen animal como el quitosano (Williams y Phillips, 2009).

Una gran variedad de proteínas también se emplean con los objetivos mencionados. Normalmente las que se utilizan proceden de plantas (de soja, trigo, maíz, arroz, guisante, cacahuete, girasol, algodón, patata, etc.), de animales (caseínas, proteínas del lactosuero, albúmina de huevo, gelatina, etc.) o incluso de hongos (hidrofobinas) (Coltelli et al., 2016).

Entre las aplicaciones de los hidrocoloides actualmente se incluye la elaboración de envases comestibles.

1.2. ENVASES DE HIDROCOLOIDES: CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES

La calidad de los alimentos y su vida útil decrecen cuando estos interaccionan con el medio que les rodea, por ejemplo, perdiendo agua o aromas, entrando oxígeno que causa oxidaciones lipídicas o facilitando la entrada y crecimiento de microorganismos que los alteran o incluso provocan toxiinfecciones alimentarias. La manera de luchar contra estas interacciones es el empleo de envases.

En la actualidad, los plásticos sintéticos, fundamentalmente los derivados del petróleo (polietileno, poliestireno, polipropileno, etc.), son los que más se utilizan como envases para alimentos. Reemplazaron en el siglo XX al papel y a otros productos basados en la celulosa por sus mejores propiedades físicas y químicas: son resistentes, tienen excelentes propiedades de barrera, son opacos, estables, no se estropean con el agua y además son baratos. Por ello, en la actualidad se utilizan en la mayoría de los alimentos y bebidas que consumimos. Sin embargo, su uso plantea problemas medioambientales debido a que no se degradan o su degradación es muy lenta en el medio ambiente (Shah et al., 2008). Por este motivo, ha surgido un gran interés en el desarrollo de envases biodegradables y a ser posible comestibles, aunque tengan el inconveniente de tener un coste más elevado. Entre ellos, están los envases obtenidos a partir de hidrocoloides.

Los envases biodegradables son aquellos que se degradan completamente por la acción de microorganismos, dando lugar a dióxido de carbono, agua, metano y algo de biomasa. Se necesita un ambiente húmedo, templado, con un pH apropiado, nutrientes, oxígeno y tiempo para que los microorganismos procedan al proceso de biodegradación (Krochta, 2002). Los envases comestibles son los que cubren al alimento y pueden consumirse como parte de él. Le imparten algunas características, pero manteniendo su calidad al disminuir las pérdidas de agua, las reacciones químicas adversas, modificar el intercambio de gases, mejorar la estabilidad microbiológica, etc. Se dividen en tres categorías dependiendo del tipo de compuesto empleado en su formulación: envases de hidrocoloides, de lípidos y de mezclas de lípidos e hidrocoloides (Osorio et al., 2011).

Los envases elaborados con hidrocoloides son comestibles y/o biodegradables, dependiendo de su formulación, método de formación y tratamientos de modificación. Cuando para su elaboración se emplean proteínas, carbohidratos y aditivos (como plastificantes) de calidad alimentaria, y se realizan sólo cambios para su elaboración como tratamientos térmicos, modificación del pH, adición de sales o enzimas y eliminación posterior del agua, el envase resultante es comestible (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). Sin embargo, es posible que los envases elaborados con hidrocoloides sean biodegradables pero no comestibles. La comestibilidad se pierde cuando se añade algún componente no comestible a la formulación del material de envasado, por ejemplo, nanoarcillas.

Estos envases se pueden elaborar de dos maneras. La primera consiste en la formación del envase antes de contactar con el alimento, tal y como se hace con otros materiales como los plásticos. En este caso se denomina film o película (*film* en inglés) y tiene integridad propia e independiente del producto. Al colocarse sobre el alimento, debe tener una buena adhesión a su superficie, proporcionando así una protección uniforme. Puede utilizarse como envoltura externa o para separar componentes. La segunda manera consiste en la formación del envase directamente sobre la superficie del alimento que va a proteger. Se denomina recubrimiento, envuelta o cubierta (*coating* en inglés) y forma parte del alimento permaneciendo junto a él hasta que éste se consume (Krochta, 2002).

Las utilidades que pueden tener los envases basados en hidrocoloides dependen en gran parte de los alimentos que van a recubrir, pero de una manera general se puede señalar que se emplean con la función de ser una barrera a la humedad, oxígeno, aromas, lípidos, etc. (Krochta, 2002) (Figura 1). Esta barrera, dependiendo de los casos, puede ser total o parcial, considerándose el envase como impermeable o semipermeable, respectivamente. La separación puede ejercerse entre el alimento y el medio que le rodea o entre los diferentes componentes del alimento (Greener Donhowe y Fennema, 1994).

Por ejemplo, el envase puede regular la entrada y salida de agua del alimento; en general, lo que se busca es reducir o controlar la

pérdida de humedad del producto, como en las cubiertas de las frutas. Sin embargo, también puede servir para estabilizar los gradientes de actividad de agua entre ingredientes con diferentes contenidos de agua preservando así las propiedades de textura de los distintos componentes alimentarios, por ejemplo en las pizzas, manteniendo los productos esponjosos (Greener Donhowe y Fennema, 1994). En otros alimentos, la absorción de humedad puede afectar negativamente a su estructura, textura y sabor, especialmente en los que tienen baja actividad de agua (frutos secos, alimentos deshidratados, etc.).

Igualmente el envase puede ser barrera frente a los lípidos, lo que puede ser útil para separar diferentes ingredientes como en el caso de la industria de la confitería, reduciendo la migración por ejemplo en las cubiertas de chocolate (Greener Donhowe y Fennema, 1994). También sirve para la disminución de la absorción de grasa durante la fritura de alimentos, mejorándolo desde el punto de vista nutritivo al obtener un producto con menos aceite (Pavlath y Orts, 2009).

En frutas y verduras, se necesita que los envases sean semipermeables al O_2 y CO_2 ; normalmente se trata de reducir la absorción de O_2 por la fruta para ralentizar su respiración pero no deben ser envases totalmente impermeables. Sin embargo, en los alimentos ricos en grasa, que el envase sea impermeable al O_2 puede ser importante para disminuir la oxidación lipídica y alargar la vida útil del producto (Greener Donhowe y Fennema, 1994). En estos alimentos también es interesante que los envases sean opacos, ya que la luz, sobre todo la radiación ultravioleta, cataliza la oxidación lipídica (Debeaufort et al., 1998).

Los envases comestibles también pueden ayudar a mantener las características organolépticas del alimento, por un lado, impidiendo la salida de los componentes volátiles, pero también evitando la entrada de aromas que causan una pérdida de calidad. Pero además, en ciertos alimentos, pueden mejorar la apariencia del producto, dando un color o brillo más atractivo, como es el caso de las manzanas en los supermercados que presentan un brillo no natural o de ciertos dulces como los M&M (Pavlath y Orts, 2009).

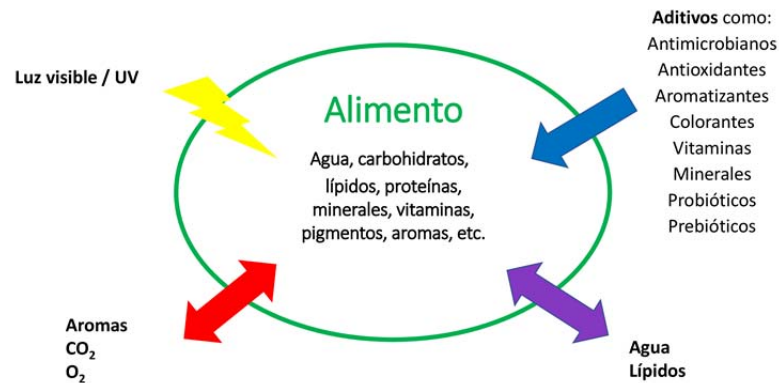


Figura 1. Propiedades funcionales de un recubrimiento comestible.

Un aspecto importante a considerar es que pueden proporcionar integridad estructural a los alimentos (como en las cubiertas de las pizzas manteniendo cada componente en su sitio durante la distribución) y prevenir daños durante su transporte y manejo como en frutas y verduras (Greener Donhowe y Fennema, 1994).

Las películas de hidrocoloides pueden ser útiles para las funciones comentadas excepto cuando se busque evitar la entrada o salida de agua, ya que no impiden la migración del vapor de agua; aunque poseen buenas propiedades de barrera frente a los lípidos, al O_2 y al CO_2 . Además, la mayoría tienen propiedades mecánicas adecuadas lo que les hace muy útil para mejorar la estructura integral de productos frágiles (Greener Donhowe y Fennema, 1994).

Su naturaleza hidrofílica sí puede ser útil para otra de las funciones de los films, ya que pueden portar aditivos como antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes, colorantes, vitaminas, minerales, probióticos, prebióticos, etc. (Figura 1). Además, pueden vehicular nutrientes y nutraceuticos que estén presentes en baja cantidad en los alimentos (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Estas adiciones pueden mejorar las propiedades funcionales, organolépticas y nutricionales de los films comestibles. Muchas de estas

incorporaciones hacen que los envases se denominen activos pues la adición de estos agentes permite mejorar la calidad y seguridad de los alimentos alargando su vida útil. Si además se consigue que los alimentos sean más saludables, se denominan envases bioactivos (Martín-Belloso et al., 2009).

1.3. HIDROCOLOIDES EMPLEADOS PARA ELABORACIÓN DE FILMS

1.3.1. Polisacáridos

La estructura de los polisacáridos está basada en la repetición de un solo monómero, como la glucosa en el caso de la celulosa o el almidón, o de varios, como el mucílago de chía. Por tanto, tienen una secuencia estructural sencilla. Sin embargo, la conformación estructural puede ser más complicada. Los polisacáridos pueden ser lineales o ramificados, tener carga neutra (como la metilcelulosa), negativa (como los carragenatos, alginatos, la pectina o algunas gomas) o positiva (como el quitosano) según los grupos químicos unidos a los monosacáridos, tener un mayor o menor peso molecular y que el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares sea diferente. Estas características estructurales determinan sus propiedades formadoras de películas. Los polímeros lineales de peso molecular alto y carga neutra como la metilcelulosa forman películas fuertes mientras que los más ramificados forman films más débiles (Nieto, 2009). En general, los polisacáridos suelen producir películas con buenas propiedades mecánicas siendo también barreras eficientes a O₂ y CO₂, aromas y lípidos; sin embargo, su naturaleza hidrofílica hace que no sean una buena barrera para el agua (Guilbert, 1986; Kester y Fenemma, 1986).

Se han utilizado muchos polisacáridos para la elaboración de películas y recubrimientos, siendo los principales la celulosa y derivados (carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa y metil celulosa), galactomananos, pectinas, quitosano, carragenatos, alginatos y almidones (Ganiari et al., 2017). Además, siguen surgiendo nuevos films comestibles a partir de polisacáridos como el mucílago de chía (Muñoz et al., 2012), la goma ghatti (Zhang et al, 2016) o los polisacáridos producidos por el hongo *Flammulina*

velutipes (Du et al., 2016). Su empleo es cada vez más importante como material para envasado innovador por su ubicua presencia en la naturaleza, así como por su relativo bajo coste comparado con otros biopolímeros. Los polisacáridos cumplen todos los aspectos medioambientales al proceder de materiales renovables y ser biodegradables. Además tienen la posibilidad de ser metabolizados por el cuerpo humano junto con el alimento, lo que hace que sean muy apropiados para utilizarse como films comestibles (Valdés et al., 2015).

De todos ellos, el almidón es el más estudiado ya que está disponible en grandes cantidades, a bajo coste y además es completamente degradable. Además, el almidón nativo se puede convertir en el denominado “almidón termoplástico” cuando se trata en condiciones de altas temperaturas y cizalla con plastificantes (glicerol o sorbitol); tiene la ventaja de que se puede someter a extrusión, inyección o soplado como los polímeros de envasado sintéticos. Aunque tiene peores propiedades mecánicas y de resistencia al agua que los polímeros sintéticos (Rhim y Ng, 2007; Zhao et al., 2008; Peelman et al., 2013), ya es una alternativa al poliestireno en algunas aplicaciones comerciales como bandejas termoconformadas (Tang et al., 2012), siendo útil para alimentos con baja actividad de agua o que necesiten bajos niveles de humedad como galletas.

Debido a la gran cantidad de residuos que se generan en el procesado de crustáceos (gambas, langostinos, krill, etc.) y por sus interesantes propiedades funcionales y biológicas, están aumentando mucho los estudios sobre las posibles utilidades del quitosano, entre ellos la elaboración de films. A continuación se describirá más detalladamente por ser el carbohidrato utilizado para elaborar films en la parte experimental de esta Tesis Doctoral.

1.3.1.1. Quitosano

El quitosano procede de la quitina que es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza tras la celulosa. La quitina (Figura 2) se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos, en las paredes

celulares de hongos, insectos y diatomeas marinas; en 1811, el francés Henri Braconnot la aisló por primera vez en algunos hongos.

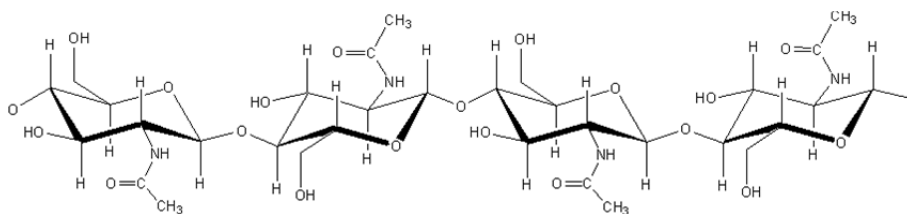


Figura 2. Molécula de quitina.

Se ha calculado que al menos $1,1 \times 10^{13}$ Kg de quitina están presentes en la biosfera. Es un polisacárido catiónico constituido por unidades de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4) y se encuentra en altas cantidades en los residuos del procesamiento de crustáceos (principalmente del exoesqueleto) en las industrias alimentarias. Sin embargo, se encuentra asociado a proteínas, minerales y pigmentos como carotenoides, por lo que para su extracción hay que aplicar un procesamiento consistente en desmineralización, desproteinización y blanqueado. Se ha calculado que podrían estar disponibles anualmente unas 76.000 T de quitina y tiene la ventaja de que se consigue a bajo precio. Además, hay una nueva fuente de quitina, que es la concha de los moluscos cefalópodos (la pluma del calamar o el jibión de la sepia) (Venugopal, 2011).

C. Rouget descubrió el quitosano en 1859; aunque se encuentra en la pared celular de algunos hongos, principalmente se obtiene por desacetilación parcial de la quitina por métodos químicos (tratamientos alcalinos con hidróxido potásico o preferiblemente con hidróxido sódico a temperaturas entre 80 y 140°C) o enzimáticos (desacetilasas producidas por hongos como *Mucor rouxii*, *M. mechei* y *Aspergillus niger*). Por tanto, la estructura del quitosano está formada por unidades de glucosamina y N-acetil D-glucosamina (Figura 3). Se requiere un mínimo del 70% de desacetilación para producir un quitosano aceptable. Su peso molecular (normalmente entre 100 y 1.000 KDa), el grado de desacetilación y el porcentaje de grupos amino que quedan libres determinan las propiedades del quitosano.

Por ejemplo, la viscosidad se correlaciona positivamente con el peso molecular y el grado de desacetilación (Venugopal, 2011).

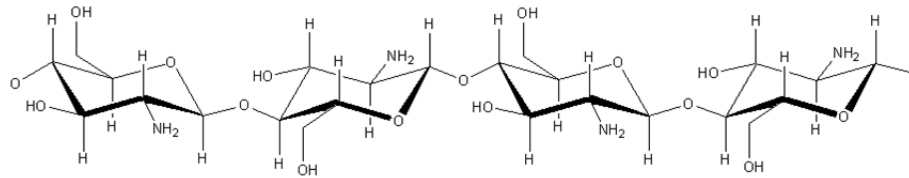


Figura 3. Molécula de quitosano.

El quitosano es un sólido no tóxico, biodegradable, insoluble en agua pura pero soluble en medio acuoso ácido ($\text{pH} < 6,0$), lo que se atribuye a su naturaleza semicristalina derivada principalmente de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (Venugopal, 2011). Se ha demostrado que es comestible pues puede degradarse en el sistema digestivo por la enzima lisozima aunque también pueden actuar lipasas y proteasas, liberándose oligosacáridos, monosacáridos y glucosaminas que pueden ser absorbidos e incorporados a las rutas metabólicas (Muzzarelli, 1997; Mengatto et al., 2012).

De sus propiedades es muy destacable su capacidad antimicrobiana contra muchas bacterias, tanto Grampositivas como Gramnegativas, levaduras y hongos. El mecanismo exacto de su actividad antibacteriana todavía no se conoce porque influyen factores como la composición del quitosano y el pH del medio. En medios ácidos (por debajo del pK_a del quitosano), éste es policationico, con afinidad natural por moléculas cargadas negativamente; el grupo amino NH_2 forma NH_3^+ lo cual tiene actividades antifúngica y antibacteriana, ya que los cationes enlazan los sitios aniónicos de paredes celulares de hongos y bacterias. A pH superiores del pK_a , la actividad antibacteriana del quitosano se explica por sus propiedades quelantes (Kong et al., 2010). La capacidad quelante y la de captar radicales libres le confiere igualmente propiedades antioxidantes (Yen et al., 2008).

Por su capacidad antimicrobiana y quelante de metales, pero también por sus propiedades espesante, gelificante y emulsionante, y por ser biodegradable y no tóxico, las aplicaciones del quitosano son

muy variadas en las industrias alimentarias, textiles y farmacéuticas, medicina, agricultura, tratamiento de aguas, etc. Una de estas utilidades es la de elaboración de films para alimentos (Venugopal, 2011; Wang et al., 2018). El quitosano se autorizó como aditivo alimentario en Japón y Corea en los años 1983 y 1995 respectivamente (Valenzuela y Arias, 2012) y en 2013 también ha sido aprobado como aditivo alimentario GRAS (generalmente reconocido como seguro) por *United States Food and Drug Administration* (USFDA) (Romanazzi et al., 2016). En la Unión Europea, se comercializa como atrapador de grasa y con el objetivo de reducir el peso y el colesterol, estando aprobado su consumo en cantidades de hasta 3 gramos al día [UE nº 432/2012 (2012)]; sin embargo, no está aún autorizado para su utilización en alimentos como ingrediente funcional.

1.3.2. Proteínas

Las proteínas, a diferencia de los polisacáridos, se basan en la secuencia de diferentes monómeros, en concreto de unos 20 aminoácidos. Estos tienen en común que contienen un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$) unidos a un átomo de carbono central. No obstante, cada aminoácido tiene diferentes radicales unidos a ese carbono central lo que da un carácter único a cada uno. Este grupo puede ser no polar (hidrofóbico) o polar (hidrofílico) y cargado positiva o negativamente a pH 7 (Cheftel et al., 1985).

La mayoría de las proteínas tienen entre 100 y 500 aminoácidos. Dependiendo de la ordenación de estos (estructura primaria), la proteína tendrá diferentes estructuras (láminas β , hélices α , etc.) a lo largo de la cadena polimérica (estructura secundaria) basadas en puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes disulfuro entre los aminoácidos (Cheftel et al., 1985). La estructura terciaria refleja como las secundarias se ordenan entre ellas basándose en los mismos tipos de interacciones, formando proteínas fibrosas o globulares. Finalmente, la estructura cuaternaria nos indica como las proteínas interaccionan entre ellas para formar una única estructura o actividad biológica (Cheftel et al., 1985).

Las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria pueden modificarse por varios agentes físicos y químicos como el calor, tratamientos mecánicos, presión, irradiación, ácidos, álcalis, iones metálicos, etc. (Cheftel et al., 1985). Tales agentes se utilizan a menudo para la formación de films y cubiertas y modifican las propiedades del film resultante (Krochta, 2002). Por tanto, basándose en esta composición química y estructura, con un gran número de grupos funcionales e interacciones, y con las diferentes maneras de modificarlas (química, física y enzimáticamente) se pueden elaborar envases proteicos para alimentos que pueden adaptarse a las necesidades de cada aplicación (Hernandez-Muñoz et al., 2005).

Las películas a partir de proteínas tienen una serie de propiedades que son de gran interés para la industria alimentaria. Pueden elaborarse films que sean excelentes barreras al oxígeno, aroma y lípidos, similares a los mejores films sintéticos (Krochta, 2002). Además, es muy interesante la actividad antioxidante que aportan determinadas proteínas, como las lácteas [caseínas (Cervato et al., 1999) y proteínas del lactosuero (Tong et al., 2000)], las vegetales [por ejemplo, la zeína del maíz (Wang et al., 1991) y la gliadina del trigo (Iwami et al., 1987)] o las animales [la gelatina de pescado (Alemán et al. 2011)].

El interés por los films a base de proteínas ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a sus ventajas respecto a los elaborados a partir de derivados del petróleo ya que son biodegradables y se extraen de fuentes renovables (Zink et al., 2016). Además, se ha señalado que son mejores que los elaborados con polisacáridos porque tienen mejores propiedades mecánicas y de barrera y un mayor valor nutricional (Cuq et al., 1998; Tharanathan, 2003; Khwaldia et al., 2004). También tienen buenas propiedades ópticas (brillo y transparencia), pero su principal desventaja es su gran sensibilidad al agua que hace que sus propiedades mecánicas, su capacidad de barrera al oxígeno e incluso su integridad se vean comprometidas (Gómez-Estaca et al., 2016). Por ello, su alta permeabilidad al vapor de agua suele ser un problema (Zink et al., 2016). No obstante, la naturaleza hidrofílica de las proteínas se puede utilizar positivamente para el desarrollo de envases activos.

Para la elaboración de films y cubiertas comestibles, se han empleado proteínas globulares, tanto de origen vegetal (gluten de trigo, de salvado de arroz, zeína de maíz, de soja, de guisante, cacahuete, altramuza, pistacho, girasol, algodón, sorgo, patata, etc.) como animal (proteínas de lactosuero y albúmina de huevo) y fúngico (hidrofobinas). También se han utilizado proteínas animales fibrosas como la caseína, colágeno/gelatina, queratina y la miofibrilar de pescado (Coltelli et al., 2016).

Se profundizará en las proteínas de lactosuero por ser las empleadas para la elaboración de films en la parte experimental de esta Tesis Doctoral.

1.3.2.1. Proteínas de lactosuero

El lactosuero es el subproducto originado durante la elaboración de queso tras la separación de la cuajada, aunque se origina también durante la obtención de caseinatos (Castillo et al., 1996; Foegeding et al., 2002). Es un líquido con un 6% de extracto seco, constituido por lactosa (70% de los sólidos), minerales, trazas de lípidos y aproximadamente 0,7% de proteínas séricas (8-10% de los sólidos) (Zall, 1992; Jelen, 2003). Existen dos tipos básicos de suero lácteo, que se diferencian por el contenido mineral, la acidez y la composición de la fracción proteica (Jelen, 2003): el dulce y el ácido. El lactosuero dulce es el más abundante y es el subproducto de la coagulación enzimática de las caseínas durante la fabricación de queso a un $\text{pH} \geq 5,6$ (Zall, 1992). El suero ácido resulta de la fabricación de quesos de coagulación ácida y de la obtención industrial de caseínas. Presenta mayor contenido en ácido láctico y calcio, y menor de lactosa, siendo su $\text{pH} \leq 5,1$ (Jelen, 2003). Las proteínas mayoritarias son la β -lactoglobulina (la más abundante), la α -lactoalbúmina, la seroalbúmina y las inmunoglobulinas; el glucomacropéptido, producto de la hidrólisis de la κ -caseína por el cuajo, sólo aparece en cantidades importantes en los lactosueros dulces. Otras proteínas minoritarias pero de alto valor comercial son la lactoferrina y la lactoperoxidasa (Doulton et al., 2003).

El suero lácteo está catalogado como un residuo altamente contaminante, con una Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) de

aproximadamente 45.000 mg O₂/l; así, 100 litros de suero contaminan igual que una población de 45 personas (Riera et al., 1996). El suero se puede utilizar directamente en la alimentación animal o como fertilizante, pero se han desarrollado procesos de aprovechamiento de diversos componentes del suero lácteo. Entre ellos, destacan las proteínas, que presentan importantes propiedades, tanto tecnofuncionales (capacidad emulsionante, gelificante, etc.) como nutritivas o beneficiosas para la salud (alta concentración de aminoácidos esenciales, potencial anticancerígeno, precursores de péptidos activos, etc.) (Díaz Rubio y Cobos García, 2004). El lactosuero tiene baja concentración proteica, pero mediante la reducción o eliminación de lípidos, minerales y lactosa, se eleva su porcentaje, obteniéndose los denominados concentrados de proteínas de lactosuero (“*whey protein concentrates*”, WPC), con 25-80% de proteína, y los aislados de proteínas de suero (“*whey protein isolates*”, WPI), con contenidos iguales o superiores al 90% (Foegeding et al., 2002). La materia prima suele ser lactosuero bovino. Para la obtención de los WPC se emplean técnicas de filtración por membranas, principalmente ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). Para los WPI, se complementa la UF/DF con microfiltración o técnicas de adsorción como el intercambio iónico (Figura 4). Posteriormente se pasterizan y concentran. Ambos se comercializan en forma de deshidratados tras su tratamiento en atomizadores (Foegeding y Luck, 2003).



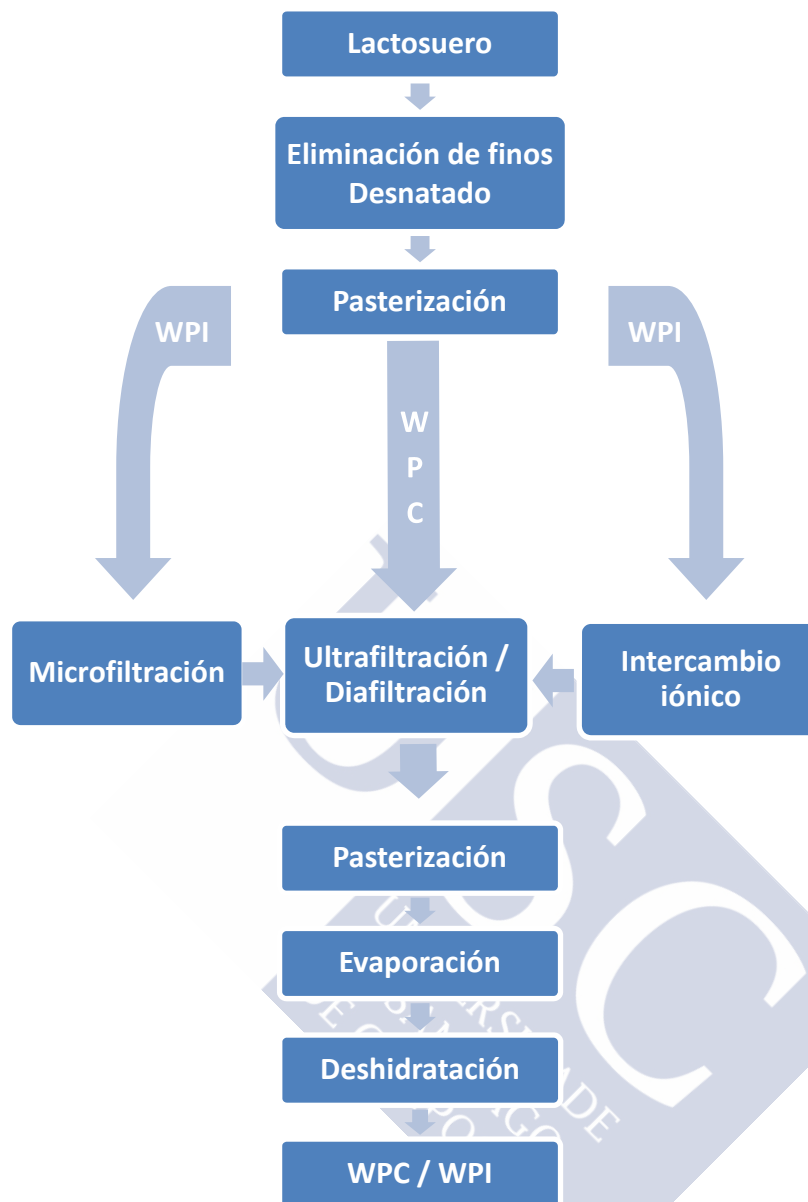


Figura 4. Esquema general de obtención de concentrados (WPC) y aislados (WPI) de proteínas de lactosuero.

La β -lactoglobulina es la principal proteína del lactosuero; en WPC se encuentra en una concentración entre 48 y 63% (Bonnaillie y Tomasula, 2008; Sanmartín et al., 2012; Svanborg et al., 2016). Su estructura primaria consta de 162 aminoácidos con un peso molecular de 18.300 Da (Pérez-Gago y Krochta, 2002). Hay varias variedades genéticas, siendo las A y B las más abundantes, difiriendo la una de la otra en dos residuos aminoácidos. Las estructuras secundaria y terciaria tienen un alto grado de organización con un 43-50% de láminas β , 10-15% de hélices α y 15-20% de giros β . Presenta cinco residuos de cisteína, de los que cuatro forman dos enlaces disulfuro intramoleculares (entre las cisteínas 160 y 66 y las 119 y 106) quedando un grupo SH libre (en la posición 121). Es una proteína globular con los grupos SH e hidrofóbicos localizados en el interior de la molécula nativa. La conformación y asociación de la β -lactoglobulina dependen del pH y de la temperatura. En el rango de pH entre 5,1 y 7,5 existe como dímero de 36.700 Da. Estos dímeros se disocian a pH superiores a 8. Sin embargo, a pH entre 3,5 y 5,2, los dímeros tetramerizan formando octámeros de aproximadamente 147.000 Da. Cuando el pH baja de 3, se disocian en monómeros. En relación a la temperatura, la β -lactoglobulina se desnaturaliza por encima de 65°C, exponiéndose los grupos SH e hidrofóbicos al exterior (Pérez-Gago y Krochta, 2002). Es entonces cuando el grupo tiol de la cisteína 121 reacciona con otros grupos tioles de otras proteínas del lactosuero formando puentes disulfuro, lo que, como se señalara posteriormente, tiene una gran influencia en la formación de films comestibles.

La α -lactoalbúmina es la segunda más abundante, representando entre el 12 y el 19% del total de proteínas del lactosuero en WPC (Bonnaillie y Tomasula, 2008; Sanmartín et al., 2012; Svanborg et al., 2016). Es también una proteína globular y contiene 123 residuos aminoácidos con un peso molecular de 14.000 Da y cuatro enlaces disulfuro. Tiene una estructura secundaria poco organizada con 30% de hélices α , un 9% de láminas β y un 61% no ordenada, lo que le da una gran flexibilidad. No obstante, la fijación de calcio y los cuatro enlaces disulfuro mantienen su estructura globular y la estabiliza frente a la desnaturalización (Pérez-Gago y Krochta, 2002). La

conformación de la α -lactoalbúmina también depende del pH y de la temperatura. A pH menor de 4, pierde el calcio iónico lo que le causa un cambio de conformación. A temperaturas de 62°C empieza a desnaturalizarse pero si se enfría vuelve a su configuración nativa. Sin embargo, con calentamientos superiores se rompen los enlaces disulfuro y se producen nuevos enlaces S-S con la β -lactoglobulina por lo que la reversibilidad ya no es posible (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

La seroalbúmina bovina (BSA) es una gran proteína globular con 582 aminoácidos, un peso molecular de 66.000 Da, 17 enlaces disulfuro y un grupo tiol libre (Pérez-Gago y Krochta, 2002) y representa aproximadamente el 4-6% de las proteínas del lactosuero (Bonnaillie y Tomasula, 2008; Sanmartín et al., 2012). Mayor cantidad suele haber de inmunoglobulinas (8-12%) siendo la principal la inmunoglobulina G (Bonnaillie y Tomasula, 2008; Sanmartín et al., 2012).

La cantidad de caseinomacropéptido en WPC es muy variable en función de que el suero de procedencia sea dulce o predominantemente ácido siendo mayor en el primer caso; en dulces suele oscilar entre el 11 y 20% (Bonnaillie y Tomasula, 2008; Sanmartín et al., 2012), pudiendo llegar a valores del 31%, lo que puede influir en las propiedades tecnofuncionales de los WPC (Svanborg et al., 2016). Los sueros procedentes de cuajadas exclusivamente ácidas carecen de caseinomacropéptido.

1.4. OTROS COMPONENTES

La base de los films de hidrocoloides son los polisacáridos o proteínas, pero a menudo se le añaden plastificantes para mejorar la flexibilidad de los envases. También es posible incorporar al hidrocoloide un material lipídico para completar las propiedades en las que estos son deficientes (permeabilidad al vapor de agua).

Otros constituyentes son agentes emulsionantes, antioxidantes, antimicrobianos, etc., que se incorporan para mejorar la efectividad del film. De estas adiciones, nos centraremos en las incorporaciones que han sido importantes para el desarrollo de esta Tesis Doctoral: las

nanopartículas, para mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera, y los antimicrobianos, para alargar la vida útil del alimento.

1.4.1. Plastificantes

A las películas elaboradas con hidrocoloides se les suele añadir un plastificante para incrementar su flexibilidad y elasticidad, ya que sin él son quebradizas (Perez et al., 2016). El motivo de la fragilidad de estos films es que las fuerzas de atracción intermoleculares son excesivas. Los plastificantes actúan debilitando estas fuerzas de atracción al introducirse entre las cadenas poliméricas, incrementando la movilidad de las mismas (Mali et al., 2005). Los grupos hidroxilo del plastificante desarrollan puentes de hidrógeno con el polímero, reemplazando así las interacciones polímero-polímero (Gennadios et al., 1993a).

Los plastificantes son sustancias de bajo peso molecular porque se necesita que se mezclen bien con el biopolímero (Castro-Rosas et al., 2016). Los que se han utilizado en films son sorbitol, glicerol, manitol, azúcares, como sacarosa y glucosa, polietilenglicol (Amini et al., 2015; Cabello et al., 2015) y líquidos iónicos preparados con sales de imidazolio (Sankri et al., 2010). De todos ellos, el sorbitol y el glicerol son los más empleados; su adición influye sobre las propiedades mecánicas del film (módulo elástico, elongación, fuerza tensil); cuanto más alta es la concentración empleada, mayor es la elongación y menor la fuerza tensil (Castro-Rosas et al., 2016).

El problema de la incorporación de plastificantes en los films de hidrocoloides es que puede aumentar la permeabilidad al vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica. El incremento de dicha permeabilidad tiene una relación directa con la concentración de plastificante. Esto sucede en films comestibles porque, como se ha señalado anteriormente, los plastificantes debilitan las fuerzas intermoleculares entre cadenas moleculares adyacentes, lo que hace que la red formada sea menos densa y, por tanto, más permeable (Castro-Rosas et al., 2016). El grado de influencia en la permeabilidad al oxígeno depende del tipo de plastificante utilizado (Sothornvit y Krochta, 2000).

1.4.2. Lípidos

Los lípidos se han utilizado desde hace mucho tiempo para la elaboración de cubiertas comestibles; ya en China en el siglo XII se sumergían naranjas y limones en ceras para retrasar la pérdida de agua (Hardenberg, 1967). Hay distintos tipos de lípidos con los que se pueden elaborar cubiertas comestibles: ceras (de abeja, de carnauba, de candelilla, parafina, de polietileno oxidado), ácidos grasos, monoglicéridos, resinas (shellac), etc. Su utilización se debe a que actúan como barreras frente al agua. Hoy en día, las cubiertas con ceras en forma de emulsiones aceite en agua se aplican industrialmente en frutas, y son útiles no sólo porque previenen la pérdida de agua, sino que también ralentizan la respiración alargando su vida útil, mejoran la apariencia dando brillo, reducen la abrasión de la superficie durante las operaciones de manejo y tapan los pequeños rasguños que pueda haber en la superficie de estos alimentos (Hernandez, 1994).

Sin embargo, aunque hay cubiertas que sí se elaboran con lípidos, la elaboración de films con grasas tienen el problema de que quedan muy quebradizos y opacos (Castro-Rosas et al., 2016). Las grasas pueden ser útiles en las películas con hidrocoloides ya que su adición puede ayudar a contrarrestar la principal desventaja de los films con proteínas o carbohidratos, que es su permeabilidad al agua. Cualquiera de estas sustancias hidrofóbicas (ceras, aceites vegetales y minerales, ácidos grasos) pueden mejorar las propiedades de barrera frente al agua de los films (Kowalczyk y Baraniak, 2014; Rocca-Smith et al., 2016; Slavustsky y Bertuzzi, 2016).

La inclusión de los lípidos en el film de hidrocoloides se puede realizar de dos maneras: por laminación o emulsión. Las películas bicapa se obtienen por laminación de la capa de lípidos hidrofóbica sobre un film hidrofílico preformado mientras que en los films emulsionados se forman por dispersión de los lípidos en el film hidrofílico (Rhim y Shellhammer, 2005). Hay muchos trabajos sobre películas que combinan hidrocoloides y lípidos, desde Kamper y Fennema (1984) que elaboraron films con metilcelulosa y ácidos grasos hasta algunos de los más actuales como los elaborados con almidón de patata y diferentes ácidos grasos (esteárico, oleico o

linoleico) (Liu et al., 2016), con cera y almidón (Muscat et al., 2014); con cera candelilla y diferentes hidrocoloides (carboximetilcelulosa, almidón de patata, proteína de soja y gelatina) (Kowalczyk y Baraniak, 2014), con aceite de palma y goma de semilla de mezquite (Rodrigues et al., 2016) o con gluten de trigo y una mezcla de diferentes lípidos (cera de abeja y ésteres acéticos de mono y diglicéridos) (Rocca-Smith et al., 2016); todos ellos con el objetivo de disminuir la transmisión de agua. En muchos casos también se les suele incorporar agentes emulsionantes como Tween-80 (Muscat et al., 2014; Rodrigues et al., 2016).

1.4.3. Nanopartículas

La adición de nanopartículas a los biopolímeros para la elaboración de envases biodegradables se ha desarrollado recientemente para la mejora de sus propiedades mecánicas y de barrera (Dhall, 2013; Wihodo y Moraru, 2013). Con los biopolímeros y las nanopartículas se elaboran los materiales “*nanocomposite*”. Estos se originan mediante la combinación de al menos dos fases diferentes, una es la matriz y la otra es la fase dispersa nanoestructurada. Las interacciones entre ellas son muy fuertes por lo que el material nanocomposite muestra mejores propiedades que la matriz original (de Azeredo, 2013).

Las nanopartículas son partículas con al menos una de sus dimensiones en el rango de nanoescala (1-100 nm) (Zhao et al., 2008) y se pueden clasificar en tres tipos dependiendo del número de sus dimensiones que están en la escala nanométrica (de Azeredo, 2009).

- a) Tres dimensiones nanométricas; son partículas isodimensionales, por ejemplo nanopartículas de sílica esféricas.
- b) Dos dimensiones nanométricas: son los nanotubos o “*whiskers*”.
- c) Sólo una dimensión en la escala nanométrica, en forma de láminas muy finas o monocapas.

Las nanopartículas pueden ser de naturaleza orgánica (basadas en hidrocoloides) pero las más utilizadas son de naturaleza inorgánica, principalmente las de arcillas y silicatos, aunque también se han investigado otras como las de sílica (SiO_2), dióxido de titanio (TiO_2), selenio y plata.

Las nanopartículas de arcillas y silicatos se utilizan para la formación de nanocomposite porque se pueden conseguir a un bajo coste, están fácilmente disponibles y se pueden aplicar usando métodos sencillos. Se emplearon por primera vez en la fabricación de coches en los años 80, siendo en la siguiente década cuando empezó la investigación para su aplicación en la elaboración de envases para alimentos. Actualmente ya se utilizan para la elaboración de botellas extrusionadas y en films de alimentos (de Azeredo, 2009).

Hay varios tipos de arcillas (montmorillonita, saponita, hectorita, kaolinita, etc.) que pueden formar nanoestructuras útiles para el envasado de alimentos. La más estudiada de todas es la montmorillonita o cloisita (MMT). Es una arcilla consistente básicamente en un hidroxisilicato de aluminio y magnesio. En concreto, la estructura química es $M_x (Al_{4-x} Mg_x) Si_8 O_{20} (OH)_4$ donde M es un catión monovalente y x es el grado de sustitución isomorfa, y está formada por una hoja octahédrica entre dos hojas tetrahédricas (Alexandre y Dubois, 2000; Weiss et al., 2006). Las láminas permanecen con cierta unión debido a que las cargas de superficie negativa están parcialmente compensadas por cationes intercambiables como Na^+ y Ca^{2+} (De Azeredo, 2009). La superficie de la MMT es hidrofílica, lo que hace que sea mezclable con polímeros hidrofílicos, como los biopolímeros naturales. No obstante, cuando se necesita que interaccionen con polímeros hidrofóbicos, se puede modificar la MMT reemplazando los iones inorgánicos (Na^+ , Ca^{2+}) con otros iones como amonio orgánico, con lo que se forma organomontmorillonita (OMMT). Hay varios tipos de cloisita modificadas comerciales, como las Cloisitas 30B, 25A y 20A (Rhim y Ng, 2007).

Las nanoarcillas mejoran las propiedades de los films de biopolímeros ya que decrecen las permeabilidades al oxígeno y al vapor de agua. También mejoran la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas de estas películas, principalmente la fuerza tensil. Sin embargo, los efectos en la elongación no están claros, algunos autores señalan que la disminuye mientras que otros indican que la aumenta (Park et al., 2002a; Avella et al, 2005; Tang et al., 2012). Otra propiedad interesante que las arcillas pueden mejorar en

los envases es que, al poder dispersar la radiación visible y ultravioleta, protegen a los alimentos del efecto negativo de la luz (Sanchez-García y Lagaron, 2012).

Respecto a otras nanopartículas de naturaleza inorgánica, se ha observado que las de sílica (SiO_2) mejoran las propiedades mecánicas y decrecen la permeabilidad al vapor de agua en films, como los de almidón (Xiong et al., 2008). Más recientemente, Vejdani et al. (2016) encontraron que las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) afectan a la transmisión de luz ultravioleta y mejoran la barrera al vapor de agua y la fuerza mecánica de los films. Jamroz et al. (2018) destacaron que las nanopartículas de selenio y de plata también mejoran las propiedades mecánicas, dando las de plata protección frente a la luz ultravioleta y la de selenio propiedades antimicrobianas; sin embargo, hay que tener en cuenta la potencial toxicidad de estas nanopartículas.

Se ha investigado la aplicación de hidocoloides, tanto proteínas como carbohidratos, como nanopartículas orgánicas en la elaboración de envases. Dentro de los carbohidratos, se ha estudiado la celulosa, el almidón, la quitina y el quitosano.

Los nanocristales o nanowhiskers de celulosa pueden mejorar las propiedades de barrera frente al vapor de agua y los gases de los films pero tienen el inconveniente de que se necesita mucho tiempo para el proceso de elaboración, el rendimiento que se obtiene es bajo y además tienen problemas de dispersión en biopolímeros hidrofóbicos (Sanchez-García y Lagaron, 2010; Sanchez-García et al., 2010; George y Siddaramaiah, 2012).

Los nanocristales de almidón en películas de pululano decrecen la permeabilidad frente al vapor de agua y mejoran las propiedades mecánicas de los films (Kristo y Biliaderis, 2007).

También se ha observado que las nanopartículas de quitosano mejoran las propiedades mecánicas y de barrera de algunas películas basadas en puré de frutas (De Azeredo, 2009; Martelli et al., 2013). Los nanowhiskers de quitina se han empleado en films de proteínas y carbohidratos para mejorar su fuerza tensil y resistencia al agua y decrecer su permeabilidad al vapor de agua y su elongación a la rotura (Lu et al., 2004, Sriupayo et al., 2005; Zeng et al., 2012).

En relación a las nanoestructuras de proteínas, con las de lactosuero pueden formarse nanopartículas o nanotubos (Graveland-Bikker y de Kruif, 2006; Loveday et al., 2012), pero todavía no se han encontrado evidencias de su utilización para elaboración de películas. Sí se han desarrollado mezclas de arcillas y zeína para mejorar propiedades mecánicas y de barrera de los films (Alcantara et al., 2012).

Como se ha señalado anteriormente, las arcillas, especialmente la montmorillonita o cloisita, son las más utilizadas para elaborar nanopartículas en envases alimentarios y se han seleccionado para la elaboración de películas en la presente Tesis Doctoral. Por ese motivo, se describe a continuación y con más detalle la aplicación de las nanoarcillas para elaboración de nanocomposites con hidrocoloides, para su uso en envases para alimentos. Se ha estudiado una gran variedad de ellos, tanto proteínas como carbohidratos. En general, el empleo de nanoarcillas es útil para mejorar las características más débiles de estos films, que son su solubilidad y permeabilidad al vapor de agua, obteniéndose también mejores propiedades mecánicas, especialmente la fuerza tensil.

En relación con los carbohidratos, se han elaborado nanocomposites de nanoarcillas con almidón, alginatos, agar, carragenatos y quitosano. De todos ellos, el almidón es el más estudiado como base para el desarrollo de bionanocomposite ya que, como se dijo anteriormente, se dispone de él en grandes cantidades, a bajo coste y además es completamente degradable. Para mejorar las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua del almidón por sí sólo o como almidón termoplástico son muy útiles las nanoarcillas. La más estudiada para mezclar con el almidón es la montmorillonita, pero también se ha trabajado con kaolinita y hectorita (Zhao et al., 2008; Plackett y Siró 2012; Tang et al., 2012). Efectivamente, se ha visto que la adición de nanoarcillas decrece la permeabilidad al vapor de agua de los films y mejora sus propiedades mecánicas, especialmente la fuerza tensil (Park et al., 2002a; Tang et al., 2012). La extensión de la modificación de las propiedades mecánicas está influida por el método de mezcla de la arcilla con el almidón, el tipo de catión de la arcilla y el contenido del plastificante

(glicerol) (Majdzadeh-Arkadani et al., 2010; Müller et al., 2011; Gao et al., 2012).

La montmorillonita también se ha mezclado con alginatos causando una reducción de la permeabilidad al vapor de agua y una mejora en la fuerza tensil de las películas, aunque este efecto dependió de la dosis de MMT empleada (Abdollahi et al, 2013). También se ha observado la posible utilidad de los films de nanocomposite de agar/MMT como material de envasado (Rhim, 2011). Este autor comparó dos niveles de adición de Cloisita Na⁺ (5 y 10%), lo que influyó en sus propiedades. La más alta adición de MMT dio lugar a mayor fuerza tensil, afectando también a las propiedades barrera al vapor de agua y solubilidad del film. Rhim (2012) desarrolló films con diferentes proporciones de κ -carragenato y agar con la adición de Cloisita Na⁺. La nanoarcilla también mejoró las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de las películas.

Los films de nanocomposite de quitosano/MMT mostraron menores permeabilidades al vapor de agua y a los gases, descenso de la elongación a la rotura y mayores estabilidades térmicas, fuerza tensil y opacidad que los de quitosano, siendo estos efectos directamente relacionados con la cantidad de MMT adicionada (Abdollahi et al, 2012; Kasirga et al, 2012). El empleo de MMT modificada con persulfato potásico mejoró también las propiedades mecánicas del film de quitosano (Lin et al., 2005). Xu et al. (2006) encontraron diferencias en las propiedades de las películas entre el empleo de MMT (Cloisita Na⁺) y una cloisita modificada (Cloisita 30B). La fuerza tensil de los films de quitosano se incrementó con la adición de cantidades pequeñas de MMT pero no significativamente cuando se añadió Cloisita 30B. La elongación a la rotura descendió con la adición de ambas arcillas, pero no significativamente con MMT. Dias et al (2014) desarrollaron films de quitosano/MMT a los que incorporaron α -tocoferol encapsulado con buenos resultados, lo que hace que estas películas tengan potencial como envase activo.

Giannakas et al. (2014) igualmente elaboraron films de nanocomposite de quitosano/MMT y observaron cómo influyó la concentración de quitosano en una solución acética en las propiedades de las películas; también estudiaron el efecto de la adición o no de

glicerol. Encontraron que su incorporación tiene un efecto negativo en la rigidez, fuerza y permeabilidad al vapor de agua, mientras que provoca un efecto positivo en la elongación a la rotura y en el agua adsorbida en los films. Vlachá et al. (2016), en estos mismos tipos de films (nanocomposite de quitosano/MMT), compararon los efectos como plastificantes de glicerol y ácido oleico, observando que el glicerol es más efectivo como plastificante en ciertas propiedades, como estabilidad contra la absorción de agua, mientras que el ácido oleico es mejor para disminuir la permeabilidad al vapor de agua. Boesel (2016) continuó estudiando el efecto de la adición de plastificantes en las propiedades de películas de quitosano y MMT, comparando glicerol con un nuevo plastificante (líquido iónico basado en imidazolio), concluyendo que, aunque es mejor el líquido iónico, ambos permiten mejorar la flexibilidad de los nanocomposites; sin embargo, provocan efectos negativos en las propiedades barrera.

También se ha observado que la adición de antioxidantes procedentes de plantas a estos films de montmorillonita y quitosano, además de mejorar lógicamente sus propiedades contra la oxidación, reducen la permeabilidad al vapor de agua de los films (Qin et al., 2015; Beigzadeh Ghelejlu et al., 2016).

Las arcillas también se han utilizado en la mejora de las propiedades de los films tanto de proteínas vegetales como animales. Las principales proteínas vegetales que se han combinado con nanopartículas para elaborar nanocomposite son las de soja, zeína de maíz y gluten de trigo. Los films composite de proteína de soja con arcillas (MMT, OMMT, etc.) han sido muy estudiados (Dean y Yu, 2005; Rhim et al., 2005; Chen y Zhang, 2006; Yu et al., 2007; Echeverría et al., 2014). Para conseguir la mezcla de la proteína con la arcilla hay que hacer una agitación muy vigorosa y un tratamiento con ultrasonidos. Estos films tienen mayor fuerza tensil, estabilidad térmica y menor permeabilidad al agua y solubilidad que los de proteína de soja sin adición de arcillas. Las atracciones electrostáticas y las interacciones puente de hidrógeno en la superficie de contacto entre las proteínas y las arcillas son las responsables de la dispersión de las nanopartículas en la matriz proteica, produciendo estructuras intercaladas cuando se utilizan altos contenidos de arcillas y

estructuras exfoliadas con menores cantidades (Chen y Zhang, 2006; Kumar et al., 2010) (Figura 5). Se han conseguido films de nanocomposite con 10% de MMT modificada con propiedades mecánicas comparables a los de los plásticos que se usan en la industria alimentaria aunque su permeabilidad al vapor de agua es mayor, lo que limita su aplicación práctica (Kumar et al., 2010).

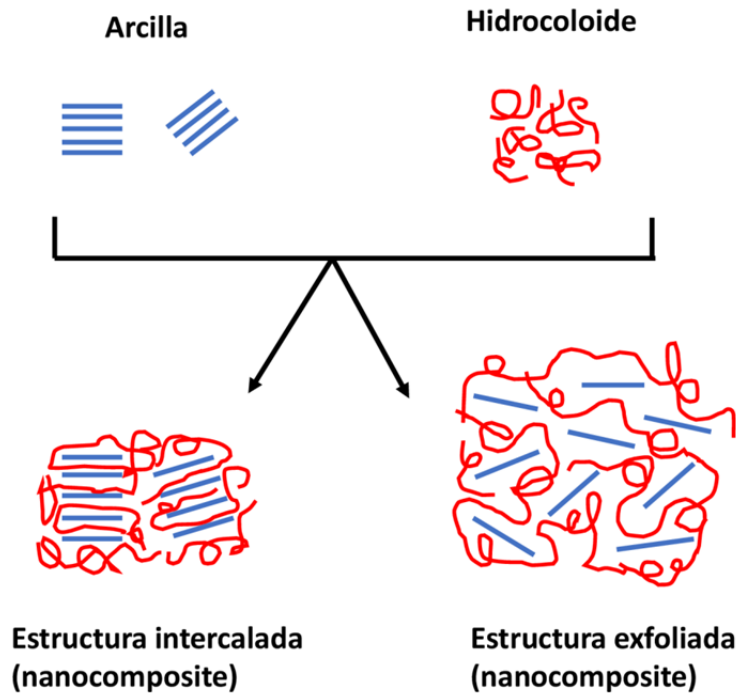


Figura 5. Tipos de composite derivados de la interacción entre nanopartículas y polímeros (adaptado de Alexandre y Dubois, 2000)

Luecha et al. (2010) fabricaron películas nanocomposite de zeína/MMT observando que, cuanto más MMT se incorporó, mayor fue la resistencia térmica de los films, mientras que las propiedades mecánicas y de barrera no mostraron esa relación lineal con la concentración de MMT; se necesitaban cantidades por encima del 5% para mejorar estas propiedades. Tunc et al. (2007) prepararon films nanocomposite de gluten de trigo/MMT y observaron que la

incorporación de MMT redujo la sensibilidad al agua, permeabilidades al aroma y vapor de agua y fuerza tensil, sin afectar a la permeabilidades al O₂ y CO₂.

En relación a las proteínas animales, hay algunos trabajos que han elaborado films nanocomposite con arcillas y proteínas de lactosuero, gelatinas bovina y de pescado. Zheng et al. (2002) emplearon gelatina bovina, encontrando que la montmorillonita mejoró la fuerza tensil de las películas. Bae et al. (2009) utilizaron gelatina de pescado que, gracias a la adición de MMT, los films elaborados mejoraron sus propiedades mecánicas y de barrera frente al oxígeno y al agua. Sothornvit et al. (2009) observaron que diferentes tipos de nanoarcillas (MMT y dos MMT modificadas orgánicamente) incorporadas en films de proteínas de lactosuero incrementaron las propiedades de barrera frente al vapor de agua, cambiaron las propiedades ópticas (color, transparencia y brillo) y no modificaron significativamente las propiedades mecánicas. Más recientemente, Pereira et al. (2016, 2017) produjeron y caracterizaron films nanocomposite de concentrados de proteínas de lactosuero y MMT con licopeno, mejorando la inclusión de MMT las propiedades mecánicas y de barrera frente al vapor de agua de las películas.

1.4.4. Antimicrobianos

La incorporación de antimicrobianos a las películas está adquiriendo gran importancia como método para mejorar sus propiedades, por lo que en este caso se pueden denominar envases activos. Su adición permite alargar la vida útil del alimento y también pueden impedir problemas importantes de salud pública que siguen apareciendo, como fallecimientos ocurridos por *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumir (Cagri et al., 2004). Estos antimicrobianos incorporados a la película se deben liberar en contacto con el alimento. La adición en el envase permite añadir menos cantidades que si se incorpora directamente en el alimento, ya que está en mayor proporción en la superficie donde el riesgo de contaminación es mayor (López et al., 2007).

Se han añadido a películas comestibles de proteínas o polisacáridos una gran variedad de compuestos con actividad

antimicrobiana para estudiar su efectividad (Cagri et al., 2004). Entre ellos están el ácido sórbico, sorbato, ácido benzoico y benzoatos, otros ácidos como el acético, propiónico, láctico y láurico, lisozima y bacteriocinas como nisina y pediocina. Aunque consigan una importante reducción microbiana, se ha continuado investigando con otras incorporaciones. La adición de bacterias lácticas a envases comestibles puede inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Gialamas et al., 2010; Lopez de Lacey et al., 2012, 2014). También se ha estudiado en profundidad el empleo de antimicrobianos de origen natural derivados de las plantas, fundamentalmente extractos y aceites esenciales. Su actividad antimicrobiana se basa en una variedad de compuestos, fundamentalmente fenólicos, pero también terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides (Tiwari et al., 2009).

Se han utilizado películas elaboradas con hidrocoloides (tanto proteínas como polisacáridos) con la adición de aceites esenciales y extractos de plantas para conservar una gran variedad de alimentos (carne, pescado, frutas, etc.), alargando su vida útil no sólo por sus propiedades antimicrobianas sino también por su capacidad para inhibir la oxidación. Sin embargo, su empleo presenta algunos problemas. Entre ellos están que pueden en muchos casos modificar el color, brillo y transparencia de los films (Sánchez-González et al., 2010a,b). Por ejemplo el extracto de pepita de uva da un color rojo al film (Rubilar et al., 2013). Otro problema es que su adición en la mayoría de los casos imparte propiedades organolépticas indeseables en los alimentos. Así, los aceites esenciales o compuestos químicos extraídos de ellos (timol, carvacrol, etc.) dan aromas característicos a los films que pueden ser rechazados por los consumidores (Burt, 2004; Rubilar et al., 2013). Por estos motivos, se están introduciendo en los envases otros compuestos que no impartan ni color, ni sabor ni olor a las películas. De ellos, los que presentan mejores propiedades para estas funciones son de síntesis.

Entre los antimicrobianos obtenidos de síntesis está el etil-N α -lauroil-L-arginato-HCl o etil lauroil arginato (LAE), que es un derivado sintetizado a partir de los compuestos naturales ácido láurico, L-arginina y etanol (Higuera et al., 2013) y tiene las características

ideales de no tener flavor, color y ser resistente a altas temperaturas. El LAE tiene propiedades antimicrobianas frente a bacterias Grampositivas, Gramnegativas, mohos y levaduras. Su mecanismo de acción se basa en que afecta a las proteínas microbianas cargadas negativamente presentes en las membranas celulares o en sistemas enzimáticos causando su desnaturalización (Pezo et al., 2012).

El efecto del LAE sobre los microorganismos patógenos ha sido estudiado in vitro utilizando diversas metodologías y se ha concluido que el LAE inhibe el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. El LAE actúa de manera más eficiente contra las bacterias Grampositivas, ya que las Gramnegativas poseen doble membrana celular (externa y citoplasmática), lo que restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de su recubrimiento de lipopolisacáridos; por este motivo son menos susceptibles a la acción de este agente antimicrobiano. Se ha estudiado también la actividad antimicrobiana del LAE cuando se emplea en la elaboración de envases activos, y para ello se ha combinado con otros compuestos como biopolímeros, nisina o quitosano. Diferentes estudios han demostrado que la adición de quitosano en películas con LAE incrementa significativamente la actividad antimicrobiana contra mesófilos, psicrófilos, pseudomonas, bacterias coliformes, levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas (Muriel-Galet et al., 2016).

Se ha verificado que el LAE no es tóxico y se metaboliza rápidamente tras su consumo a arginina y ácido láurico (Muriel-Galet et al., 2014). Por esta razón, el LAE está reconocido como “generalmente reconocido como seguro” (GRAS) por la *Food and Drug Administration* (FDA) (Higueras et al., 2013) y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Pezo et al., 2012). Está recogido en la lista de aditivos como E-243. Todas estas características hacen del LAE un compuesto muy interesante para añadirlo como agente antimicrobiano en envases activos para extender la vida útil de los alimentos.

1.5. FILMS DE QUITOSANO

El quitosano tiene excelentes propiedades para elaborar films, siendo dichas películas comestibles, flexibles, transparentes y con buenas propiedades mecánicas, presentando una alta barrera al O₂ y CO₂ y actividad antimicrobiana; pero, como sucede con los demás polisacáridos, tienen una alta permeabilidad al vapor de agua (Elsabee y Abdou, 2013; Wang et al., 2018). Sin embargo, estas propiedades varían en función de las características del quitosano empleado pues el grado de desacetilación y su peso molecular influyen en sus propiedades mecánicas (Park et al., 2002b). Respecto a su alta permeabilidad al vapor de agua, puede incrementarse su hidrofobicidad y mejorar esta propiedad, como señalamos anteriormente, con la adición de ceras y arcillas como la montmorillonita (Elsabee y Abdou, 2013).

Wang et al. (2018) han publicado una revisión donde se recogen los trabajos publicados con envases en los que se emplea quitosano. Hay investigaciones sobre films elaborados sólo con él, a los que se les añadió únicamente en algunos casos plastificantes (glicerol, sorbitol) o emulsionantes (Tween 80, Tween 20, etc.) y que se han utilizado para alargar la vida útil de diversos alimentos como zanahorias, tomate, mango, pescado, papaya, etc. Sin embargo, hay muchas más publicaciones de envases elaborados mediante combinación de quitosano y biopolímeros que incluyen carbohidratos (almidón, celulosa, alginato, pectina, etc.), proteínas (caseinato, colágeno, gelatina, etc.) y otros compuestos (cera de abeja, extracto de naranja, aceites esenciales, etc.) para mejorar sus propiedades mecánicas y de permeabilidad. Incluso se ha combinado quitosano con algunos polímeros sintéticos como polietileno de baja densidad para introducirles actividad antibacteriana (Martínez-Camacho et al., 2013; Wang et al., 2015). Por su actividad quelante, el quitosano se ha empleado para preparar complejos con sustancias inorgánicas como plata, óxido de cinc, montmorillonita o dióxido de titanio, para su utilización en films y potenciar sus propiedades antimicrobianas y de barrera (Wang et al., 2018).

El método más habitual para la elaboración de films de quitosano es el de “*casting*”, también conocido como método húmedo, debido a su simplicidad (Wang et al., 2018). Se realiza en placas de Petri, platos de plástico, vidrio, aluminio, etc. La preparación se realiza básicamente mediante disolución del quitosano en solución ácida (con ácido acético, por ejemplo) a un pH determinado, mezclado, calentamiento (generalmente a temperaturas entre 25 y 50°C) y agitación con otros componentes para obtener una solución viscosa homogénea; filtración, sonicación o ultrafiltración para eliminar partículas insolubles y burbujas de aire; llenado de las placas o bandejas y secado a una temperatura, humedad relativa y tiempo determinado. Después se separa la lámina de la placa y se almacena para su posterior utilización. También es posible la elaboración de films mediante extrusión, un método también llamado proceso seco. Previamente, se mezclan los ingredientes en condiciones de humedad baja. Los otros métodos para la elaboración de envases a partir de quitosano se basan en cubiertas que se forman sobre el propio alimento mediante inmersión o rociado (Wang et al., 2018).

Las películas de quitosano tienen potenciales aplicaciones en alimentos de origen animal como carne, productos lácteos, huevos, pescado y mariscos; se utilizan para alargar su vida útil por sus propiedades antimicrobianas (Valenzuela y Arias, 2012). Muchas de estas aplicaciones se utilizan en combinación con otros hidrocoloides y con la adición de compuestos antioxidantes y antimicrobianos; por ejemplo, se ha comprobado su utilidad en la conservación de pescado de films de quitosano con gelatina y con la adición de aceites esenciales como agentes antimicrobianos (Gomez-Estaca et al., 2010). Sin embargo, su utilización está más desarrollada en alimentos de origen vegetal. Se ha demostrado la utilidad de las cubiertas de quitosano para alargar la vida útil de frutas y vegetales (naranjas, manzanas, uvas, mango, fresas, lechuga, zanahorias, tomate, etc.) tras su cosecha por un doble motivo. En primer lugar reducen el crecimiento de microorganismos patógenos y hongos. El segundo motivo es que forman un film semipermeable sobre la superficie del alimento, ralentizando el ritmo de respiración y disminuyendo la pérdida de agua, lo que mantiene la calidad del alimento durante más

tiempo (Romanazzi et al., 2016). Desde hace tiempo, existe un preparado comercial, preparado a partir del quitosano, denominado Nutri-Save (Nova Chem, Halifax, NS, Canadá) que se ha utilizado como cubierta para alargar la conservación de frutas y hortalizas (Baldwin, 1994). Para cítricos, a la cubierta de quitosano se le pueden añadir antifúngicos para mejorar su eficacia (Palou et al., 2015). Además, el recubrimiento puede incorporar otros aditivos como vitaminas, minerales y compuestos nutraceuticos que incrementan el beneficio de su empleo (Romanazzi et al., 2016).

1.6. FILMS DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO

Se pueden elaborar films comestibles con soluciones de proteínas de lactosuero incluso sin tratar térmicamente con un procesamiento adecuado. Como se ha señalado anteriormente, las proteínas globulares del suero contienen la mayoría de los grupos hidrofóbicos y SH en el interior de la molécula. Cuando el agua se evapora de las soluciones, se pueden formar films comestibles a través de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas Van der Waals manteniendo las proteínas su estructura globular. Sin embargo, pueden mejorarse las propiedades de barrera y mecánicas de los films cuando se desnaturalizan las proteínas del lactosuero, principalmente mediante un tratamiento térmico de la solución proteica (Perez-Gago et al., 1999; Perez-Gago y Krochta, 2001; Schmid et al., 2014a). Esta desnaturalización expone los grupos internos hidrofóbicos y SH promoviendo enlaces intermoleculares S-S e interacciones hidrofóbicas (Perez-Gago y Krochta, 2002; Dangaran y Krochta, 2008). Ocurre principalmente una polimerización de la β -lactoglobulina a partir del grupo tiol del aminoácido cisteína 121, siendo esta reactividad dependiente de la temperatura y del pH. Hay que calentar las soluciones proteicas por encima de 75-80°C para obtener films con buenas propiedades mecánicas y de barrera (Dangaran et al., 2009; Perez-Gago, 2012). Cuando el pH sube de 6,8, el ritmo de formación de enlaces disulfuro aumenta. No obstante, la polimerización no es la única reacción química que ocurre en la formación de la red en films de proteínas de lactosuero desnaturalizadas. También hay agregaciones no covalentes a través de

interacciones hidrofóbicas, iónicas y Van der Waals entre los grupos expuestos de las proteínas por el calentamiento. Estas interacciones se incrementan cuando el pH desciende al punto isoeléctrico de las proteínas del lactosuero (Dangaran y Krochta, 2008).

Las películas elaboradas con proteínas de lactosuero (Figura 6), tanto con las nativas como con las desnaturalizadas, son transparentes y en general tienen similares permeabilidades al vapor de agua; sin embargo, poseen diferentes solubilidades y propiedades mecánicas. La estructura abierta de las proteínas del lactosuero desnaturalizadas por el calor y los enlaces covalentes S-S formados durante el secado conducen a la insolubilidad en agua y producen films más fuertes y que resisten mayores deformaciones. De todas maneras, se necesita incrementar su flexibilidad mediante la adición de plastificantes como glicerol, sorbitol y polietilenglicol. Lo consiguen rompiendo enlaces de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, reduciendo las fuerzas intermoleculares y aumentando por tanto la movilidad de las cadenas. Sin embargo, puede incrementar la permeabilidad de los films. Las películas de proteínas de lactosuero con plastificantes son transparentes, flexibles y con excelentes propiedades de barrera al oxígeno, aceites y aromas. Sin embargo, son pobres barreras de la humedad por su carácter hidrofílico. La adición de lípidos puede mejorar sus propiedades de barrera a la humedad al incrementar su hidrofobicidad (Perez-Gago y Krochta, 2002). Hay muchos trabajos de films de proteínas de lactosuero a los que se han incorporado lípidos para incrementar sus propiedades de barrera como ceras (Janjarasskul et al., 2014), aceite de oliva (Javanmard y Golestan, 2008), monoglicéridos acetilados (Anker et al., 2002) y aceite de almendras o nueces (Galus y Kadzinska, 2016).

Por su diferente composición, hay diferencias entre los films elaborados con WPC y WPI. Banerjee y Chan (1995) encontraron una menor permeabilidad al vapor de agua de los films elaborados con WPC (76,6% de proteína) que los elaborados con WPI (93,6% de proteína) lo cual se debió al mayor contenido de lípidos en los WPC (en este caso, tenían un 6,8% de grasa) que incrementa la hidrofobicidad del film y mejora las propiedades de barrera frente a la humedad. En cuanto a las propiedades de barrera al oxígeno, no se han

encontrado diferencias entre films elaborados con WPC y WPI (Hong y Krochta, 2006).

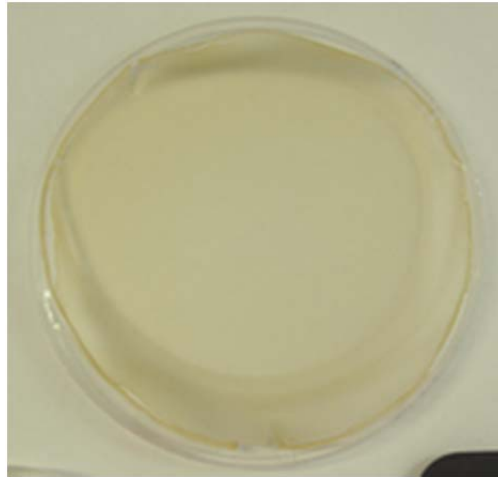


Figura 6. Película de concentrado de proteína de lactosuero.

La elaboración de films de proteínas de lactosuero se suele realizar empleando los dos mismos métodos que los señalados para el quitosano: el de “casting” o método húmedo, utilizando normalmente agua como solvente, y el de extrusión, siendo, como en el caso del polisacárido, el método “casting” el más habitual. Aunque, como se ha señalado anteriormente, se pueden elaborar films con proteínas de lactosuero sin tratamiento térmico, las propiedades mejoran cuando se desnaturalizan dichas proteínas. Se suelen tratar soluciones acuosas de proteínas de lactosuero en una concentración de 8-12% (p/p) a una temperatura entre 80 y 100°C durante unos 20 minutos y después secar a unos 21-23°C a una humedad relativa del 50% para conseguir películas adecuadas; el control del proceso de secado es muy importante pues si se realiza demasiado rápido produce películas menos flexibles (Ramos et al., 2012).

Una característica de las proteínas de lactosuero que las hace muy interesantes para la elaboración de films comestibles es su capacidad antioxidante. Cuando se desnaturalizan las proteínas, los grupos sulfhidrilo que han dejado de estar ocultos son probablemente el

componente más importante de esta propiedad; no obstante, otros mecanismos antioxidantes juegan un papel crucial, como la capacidad de neutralización de radicales libres por algunos aminoácidos (cisteína, triptófano y tirosina) y la habilidad de las proteínas de lactosuero de quelar metales (Tong et al., 2000; Elias et al., 2005; Rodríguez-Turiénzo et al., 2011). La β -lactoglobulina, la principal proteína del lactosuero, muestra una actividad antioxidante importante debido a algunos residuos aminoacídicos que puede incrementarse cuando estos se exponen al exterior tras la desnaturalización (Elias et al., 2005; Rodríguez-Turiénzo et al., 2011). Estas propiedades facilitan que se hayan desarrollado cubiertas y films para proteger alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, como el salmón (Rodríguez-Turiénzo et al., 2011). También en combinación con otros componentes se han elaborado películas para proteger la grasa; por ejemplo, Phupoksakul et al. (2017) han desarrollado bolsas con WPI y ácido poliláctico para envasar formulas infantiles a base de leche y grasas añadidas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (ácidos linoleico, linolénico y docosahexaenoico), alargando la vida útil del producto.

Los cambios en el pH de la solución proteica también pueden influir en las características de las proteínas y de las películas, como se ha observado, por ejemplo en las de proteína de soja y gluten de trigo (Gennadios et al., 1993b). En las de lactosuero, elevar el pH por encima de 7 promueve su desnaturalización, desdoblamiento y solubilización causando interacciones disulfuro y no covalentes entre distintas proteínas y por tanto su polimerización. A pH alcalinos, las proteínas de lactosuero están por encima de su punto isoeléctrico mostrando cargas negativas; los grupos cargados negativamente se repelen y producen modificaciones en la estructura de la cadena proteica y en los enlaces intermoleculares entre las moléculas en los films (Bourtoom et al., 2006). Quinn et al. (2003) investigaron la importancia de las interacciones covalentes y no covalentes en las películas de proteínas de lactosuero no calentadas elaboradas con soluciones a pH alcalino y observaron que las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno fueron los enlaces más destacables mientras que las interacciones disulfuro fueron menos

importantes en la formación de los films. Estos autores observaron diferencias en las propiedades mecánicas y en la solubilidad entre las películas de soluciones alcalinas no calentadas y las tratadas térmicamente a pH neutro.

Las películas de proteínas de lactosuero tienen muchas posibles aplicaciones en la industria alimentaria ya que son obvias sus ventajas de comestibilidad y biodegradabilidad. Además también pueden ser vectores de antimicrobianos, antioxidantes, compuestos nutraceuticos, etc. No obstante, su implementación industrial necesita todavía de más investigación y además hay que tener en cuenta en el etiquetado de los alimentos su posible alergenicidad (Ramos et al., 2012).

Además del tratamiento térmico y del pH, se han desarrollado otros métodos que modifican la estructura proteica y pueden mejorar los films de estas proteínas de lactosuero. Son tratamientos de tres tipos: químicos (formaldehído, glutaraldehído, almidón dialdehídico, carbonildiimidazol) (Ustunol y Mert, 2004), bioquímicos como la adición de transglutaminasa (Schmid et al., 2014b; Yildirim y Hettiarachchy, 1998) y físicos como la radiación ionizante (Ciesla et al., 2006), ultrasonidos (Rodríguez-Turienzo et al., 2012) y radiación ultravioleta (Ustunol y Mert, 2004; Schmid et al., 2015). Sobre este último método, se profundizará en el siguiente apartado al ser el utilizado en esta Tesis Doctoral.

1.7. APLICACIÓN DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN LA ELABORACIÓN DE FILMS

Respecto a los tratamientos físicos capaces de modificar las proteínas, la radiación ultravioleta supone una opción interesante. En el espectro electromagnético, la radiación ultravioleta (UV) ocupa un intervalo amplio de longitudes de onda en la región no ionizante, comprendido entre 200 y 400 nm, es decir, entre las longitudes de onda correspondientes a los rayos X y la luz visible. Dentro del espectro ultravioleta se diferencian tres regiones: UV de corta longitud de onda o UV-C (200-280 nm), UV de media longitud de onda o UV-B (280-320 nm) y UV de larga longitud de onda o UV-A (320-400 nm) (Ibarz et al., 2015).

Los emisores de radiación UV-C más frecuentemente empleados en aplicaciones alimentarias son lámparas de descarga de alta intensidad de mercurio, formadas por un tubo lleno de una pequeña cantidad mercurio y de un gas inerte (argón) a través del cual fluye una corriente eléctrica. En función de la presión del gas en el interior del tubo se diferencian tres tipos de lámparas, de alta, media y baja presión. Las dos últimas son las que cuentan con aplicaciones en la industria alimentaria. Las de media presión emiten en un intervalo de longitudes de onda amplio que va desde 200 hasta 600 nm (dentro del espectro visible). Las de baja presión emiten mayoritariamente a 253,7 nm (alrededor del 85% de la intensidad de UV total emitida), aunque también pueden emitir radiación a 185 nm en función del tipo de cuarzo empleado en la construcción del tubo. (Koutchma et al., 2009; Falguera et al., 2011).

La radiación UV-C se considera en la actualidad una tecnología eficiente para la inactivación no térmica de numerosos microorganismos; su efecto se debe principalmente al daño en la estructura del ADN microbiano y se aplica en el tratamiento de agua de procesado, aire y en la desinfección superficial de alimentos sólidos (Ibarz et al., 2015). No obstante, también es capaz de inducir reacciones químicas en polímeros orgánicos. A 253,7 nm los compuestos químicos que contienen dobles enlaces conjugados, tales como anillos aromáticos y dobles anillos, y moléculas que contengan enlaces disulfuro son absorbentes efectivos; así, proteínas, carbohidratos y lípidos, entre otras biomoléculas, se ven afectados (Koutchma et al., 2009).

Los polímeros fotoreactivos se caracterizan por la presencia de un cromóforo incluido en la matriz macromolecular. Al inicio, cuando la radiación UV incide sobre el polímero, el cromóforo captura la energía electromagnética y la convierte en energía química, lo que permite la fotoisomerización. De esta manera, la energía química se trasfiere a la zona funcional del polímero que controla su estructura y función, de manera que puede modificarse su conformación y producirse fenómenos de disociación y entrecruzamiento (Manzocco y Nicoli, 2015).

Las proteínas son compuestos fotorreactivos debido a la abundancia de cromóforos endógenos que contienen en su estructura, tales como ciertos aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, cisteína), y grupos prostéticos (flavín y hemo). Se considera que la fotooxidación de las proteínas se produce por dos rutas principales; la primera implica la fotooxidación directa proveniente de la absorción de la radiación UV por los cromóforos de la proteína (principalmente las cadenas laterales de los aminoácidos citados anteriormente), generándose especies en estado excitado (singlete o triplete) o radicales como resultado de la fotoionización. La segunda ruta es la oxidación indirecta de la proteína a través de la formación y posteriores reacciones del oxígeno singlete producido por la energía transferida por los cromóforos de la proteína (Davies y Truscott, 2001).

Las reacciones de fotooxidación producidas en las proteínas por la absorción de radiación UV son muy complejas y tienen como consecuencia cambios estructurales importantes que modifican su funcionalidad, como son los fenómenos de fragmentación, desplegamiento y agregación (Manzocco, 2015). La fragmentación de las cadenas proteicas se ha observado con mucha menos frecuencia que los otros cambios y sólo en algunas proteínas, tales como el colágeno, lo que se ha atribuido a la oxidación de la prolina (Kato et al., 1992; Kuan et al., 2013), o la lisozima en la presencia de un cromóforo, posiblemente debido a la oxidación de residuos de triptófano y/o a la formación de radicales generados de peróxidos formados a partir de histidina y tirosina (Davies y Truscott, 2001).

La radiación ultravioleta induce en las proteínas modificaciones en las fuerzas de unión de las proteínas, como los enlaces de hidrógeno, iónicos, interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro. Así, por ejemplo la rotura y formación de enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos dan lugar al desplegamiento de las cadenas, lo que a su vez hace que se expongan grupos reactivos, como residuos hidrofóbicos y grupos sulfhidrilo libres que luego intervienen en la formación de agregados de elevado peso molecular (Manzocco, 2015).

El grado de fotooxidación de los aminoácidos puede no estar directamente relacionado con la intensidad del desplegamiento de las

cadenas proteicas. Dentro de las proteínas lácteas, las caseínas, que tienen una estructura de espiral aleatoria (“random coil”), son más susceptibles al daño de sus aminoácidos individualmente que la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, que son proteínas globulares densamente empaquetadas. Sin embargo, los mayores cambios en las estructuras secundarias y terciarias se presentan en estas últimas, por lo que parece que bajos niveles de daños en aminoácidos particulares en las proteínas globulares tienen mayores consecuencias estructurales, sobre todo si estos están enterrados en una estructura compacta (Pattison et al., 2012).

La formación de agregados se ha atribuido a múltiples reacciones. Podrían surgir de reacciones de terminación radical-radical, en la que estarían implicados radicales de tirosina dando lugar a di-tirosina. También estarían implicadas en los entrecruzamientos reacciones que se producen después de que cese la exposición a la radiación. En este caso participan productos de la oxidación de la histidina que contienen grupos carbonilo, los cuales pueden sufrir reacciones con otros nucleófilos, como las cadenas laterales de lisina, arginina y cisteína (Pattison et al., 2012). Por otro lado se ha descrito que la aplicación de luz ultravioleta a proteínas de lactosuero da lugar a la fotólisis de enlaces disulfuro mediada por triptófano, la cual induce desplegamiento, oligomerización y agregación, formando tioles libres (Vanhooren et al., 2002; Kehoe et al., 2008). Xie et al. (2011) describen en lisozima y otras proteínas (entre ellas la α -lactoalbúmina y la seroalbúmina bovina) un mecanismo común de formación de agregados por el que la luz ultravioleta disocia los enlaces disulfuro nativos cercanos a residuos de triptófano y tirosina, produciéndose cambios conformacionales intensos que tienen como consecuencia la exposición de residuos hidrofóbicos y tioles libres. Las moléculas parcialmente desplegadas se autoensamblan en agregados pequeños debido a interacciones hidrofóbicas, que después se unen en agregados mayores gracias a los efectos combinados de las interacciones hidrofóbicas y la formación de enlaces disulfuro intermoleculares.

El desplegamiento y la agregación inducidos por la radiación UV en las proteínas afectan a las propiedades tecnofuncionales de las mismas, modificando las características de los geles que forman

(elasticidad, viscosidad, microestructura; Ishizaki et al., 1993), o mejorando sus propiedades emulsionantes y espumantes (Kuan et al., 2011). También el tratamiento de proteínas con luz ultravioleta origina la aparición de pigmentos amarillos en presencia de azúcares reductores, atribuidos a la formación de productos de la reacción de Maillard; esto se ha observado tanto en sistemas modelo (Sheldon et al., 1988) como en films proteicos (Masutani et al., 2014). La intensidad de los cambios inducidos por la radiación UV en las proteínas se ve afectada por diversos factores, como son la fotosensibilidad intrínseca de la proteína, las condiciones ambientales (concentración de proteína, factores que influyen en su estructura como el pH y la fuerza iónica, presencia de otros compuestos), y las propiedades de la radiación (longitud de onda, dosis) (Manzocco, 2015).

Dado que la radiación UV modifica la estructura y función de las proteínas, se ha aplicado en films elaborados con diversas proteínas como la zeína de maíz, el gluten de trigo, la proteína de cacahuete, la gelatina de pescado, la albúmina de huevo y el caseinato sódico (Gennadios et al., 1998; Rhim et al., 1999; Micard et al., 2000; Rhim et al., 2000; Otoni et al., 2002; Liu et al., 2004). La mayoría de los autores observaron que la radiación UV modifica las propiedades mecánicas y color de los films, pero los resultados son variables pues influye el tipo de proteína y las condiciones de aplicación del tratamiento. Generalmente se ha trabajado aplicando la radiación UV en las películas ya formadas preparadas con soluciones de proteínas tratadas térmicamente, excepto Otoni et al. (2012) que trataron directamente la gelatina. Los cambios en los films pueden ser diferentes si la radiación UV se aplica en la solución o en el film. Se conoce que la naturaleza del material y su turbidez influye en la energía absorbida y la transmitancia de la radiación UV (Koutchma, 2009; Koutchma et al., 2009), así que el estado físico, superficie, grosor y composición del material puede afectar a la acción de la radiación UV en las proteínas.

Los trabajos sobre la aplicación de radiación UV en films de proteínas de lactosuero son escasos y se han realizado utilizando aislados de proteínas de suero. Ustunol y Mert (2004) aplicaron la

radiación UV en soluciones de proteínas séricas con pH alcalino (10,0) y previamente tratadas térmicamente; estos autores observaron un incremento de la fuerza tensil, mientras que las permeabilidades al vapor de agua y al oxígeno no se vieron afectadas. Schmid et al. (2015) trataron con radiación UV films de proteínas de lactosuero previamente formados a partir de soluciones tratadas térmicamente. Observaron un incremento de la fuerza tensil y un descenso de la solubilidad de las películas. Schmid et al. (2017) obtuvieron también resultados similares respecto a la fuerza tensil, y no observaron modificaciones de las propiedades de barrera. Esto último lo atribuyeron a que las proteínas formaron una red desordenada, con volúmenes libres localmente que ofrecía una barrera reducida a la difusión de oxígeno y agua. Por otra parte la radiación UV produjo un incremento de la densidad y el grado de entrecruzamiento de las proteínas de lactosuero.

Respecto a los carbohidratos, los glucanos químicamente puros, como la celulosa bacteriana o la amilosa, absorben poca radiación UV. Sin embargo, materiales menos puros como la pulpa de celulosa y la pasta de almidón contienen cromóforos que sí lo hacen, formados durante los tratamientos térmicos, ácidos, alcalinos u oxidativos aplicados durante su obtención. La respuesta a la radiación UV podría verse intensificada por compuestos originados por la reacción de Maillard (Wondraczek et al., 2011; Manzocco y Nicoli, 2015). La irradiación de almidón en presencia de aire produce despolimerización y entrecruzamiento; la despolimerización afecta tanto a la amilosa como a la amilopectina, mientras que el entrecruzamiento lo hace principalmente a la amilosa. La intensidad y el predominio de estas modificaciones parecen depender del tiempo de exposición y la dosis (Fiedorowicz et al., 1999; Bertollini et al., 2000). El quitosano también experimenta fotodegradación cuando se somete a la radiación UV, la cual es capaz de destruir las matrices de este carbohidrato. El principal mecanismo de degradación incluye la formación de grupos hidroxilo y carboxílicos en presencia de oxígeno, con rotura de interacciones no covalentes e incluso de enlaces covalentes cuando la exposición a la luz UV es suficientemente prolongada (Sionkowska et al., 2015). El peso molecular del quitosano disminuye al

incrementarse el tiempo de exposición a la radiación, detectándose además la formación de nuevos grupos cromofóricos tras el tratamiento, probablemente como resultado de la fotooxidación (Sionkowska et al., 2013).

La radiación UV también se ha estudiado como uno de los tratamientos útiles para producir entrecruzamientos y mejorar las propiedades de los films basados en carbohidratos. Se ha empleado el benzoato de sodio como cromóforo para incrementar la fotosensibilidad y el entrecruzamiento en films de almidón (Delville et al., 2002) y como modificador de superficie de hojas de almidón sin modificar la composición de la matriz de almidón (Zhou et al., 2009). También se ha estudiado el efecto de la radiación UV en films de quitosano con y sin la adición de un cromóforo, el ácido tánico (Sionkowska et al., 2015), observándose modificaciones en sus propiedades mecánicas, estabilidad térmica y solubilidad en agua, las cuales se atribuyen tanto a la degradación de la matriz de quitosano como a fenómenos de entrecruzamiento. También se han detectado modificaciones de la humectabilidad y de la superficie de films tratados, con un descenso de la rugosidad de la misma (Sionkowska et al., 2006, 2013). En estas investigaciones la radiación UV se aplicó sobre los films previamente formados.

1.8. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

Los envases son imprescindibles para el mantenimiento de la calidad de los alimentos y de una vida útil adecuada, ya que son una barrera que los protege de las interacciones con el medio que les rodea. Los materiales más utilizados en la actualidad para fabricarlos son los polímeros derivados del petróleo, que plantean problemas medioambientales al ser su degradación difícil o muy lenta. Por ello en los últimos años se ha investigado la utilización de otros materiales, como los biopolímeros, los cuales son biodegradables e incluso algunos de ellos comestibles. Entre ellos hay que destacar los hidrocoloides, los cuales provienen de fuentes naturales y renovables. Especial interés tienen aquellos que se obtienen a partir de subproductos de la industria alimentaria, como son las proteínas del lactosuero (procedentes en su mayoría del desuerado de quesos) y el

quitosano (obtenido de la desacetilación de la quitina del caparazón de los crustáceos), cuyo aprovechamiento presenta una gran relevancia desde el punto de vista económico y medioambiental. Ambos hidrocoloides son capaces de formar films con buenas propiedades de barrera frente a los gases y aceptables propiedades mecánicas, pero son muy permeables al vapor de agua. Esto hace que, para mejorar estas características, se hayan propuesto diferentes tratamientos y/o adiciones.

En esta Tesis Doctoral se han seleccionado la radiación ultravioleta y la adición de un nanocompuesto más un antimicrobiano con dicha finalidad. Los principales resultados de este trabajo se recogen en tres capítulos, en los que se abordan los efectos del tratamiento por radiación ultravioleta en películas de concentrados de proteínas de lactosuero, su combinación con modificaciones del pH y el efecto de la adición de una nanoarcilla y un antimicrobiano a films de quitosano. Además se recogen, incluidos en la discusión general, los estudios de los efectos de la radiación ultravioleta en films de aislados de proteínas de lactosuero y de quitosano, los cuales contribuyen a integrar los capítulos antes mencionados.





OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

El objetivo principal es el desarrollo de films basados en proteínas de lactosuero o quitosano empleando tecnologías novedosas como la radiación ultravioleta (combinado o no con la modificación del pH) o la adición de una nanoarcilla y un antimicrobiano con la finalidad de mejorar sus propiedades mecánicas y físico-químicas.

Para ello se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Mejora de las películas comestibles de proteínas de lactosuero mediante:

- la aplicación de la radiación ultravioleta en diferentes dosis y momentos de aplicación (sobre la solución proteica o sobre films formados previamente), o
- la combinación de radiación ultravioleta y la alcalinización de las soluciones formadoras de los films.

2. Mejora de las películas de quitosano a través de:

- la aplicación de distintas dosis de radiación ultravioleta, o
- la incorporación del antimicrobiano LAE (etil lauroil arginato) y de la nanoarcilla Cloisita 30B.





PUBLICACIONES



**ARTÍCULO 1.
EFFECTS OF ULTRAVIOLET RADIATION
ON PROPERTIES OF FILMS FROM
WHEY PROTEIN CONCENTRATE TREATED
BEFORE OR AFTER FILM FORMATION**

Olga Díaz, Davinia Candia, Ángel Cobos

Área de Tecnología de Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo, Spain

Referencia de la publicación:

Díaz O., Candia, D., Cobos, A. (2016). Effects of ultraviolet radiation on properties of films from whey protein concentrate treated before or after film formation. *Food Hydrocolloids*, 55, 189-199.

doi: 10.1016/j.FOODHYD.2015.11.019

Editorial: Elsevier Ltd.

ISSN: 0268-005X

Enlace:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1530151X>



**ARTÍCULO 2.
WHEY PROTEIN FILMS PROPERTIES AS
AFFECTED BY ULTRAVIOLET
TREATMENT AT ALKALINE CONDITIONS**

Olga Díaz, Davinia Candia, Ángel Cobos

Área de Tecnología de Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo, Spain

Referencia de la publicación:

Díaz O., Candia, D., Cobos, A. (2017). Whey protein films properties as affected by ultraviolet treatment at alkaline conditions. *International Dairy Journal*, 73, 84-91.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.009>

Editorial: Elsevier Ltd.

ISSN: 0958-6946

Enlace:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694617301309>



**ARTÍCULO 3.
EFFECT OF NANOCLAY AND ETHYL-N α -
DODECANOYL-L-ARGINATE
HYDROCHLORIDE (LAE) ON PHYSICO-
MECHANICAL
PROPERTIES OF CHITOSAN FILMS**

Javiera F. Rubilar^a, Davinia Candia^b, Ángel Cobos^b, Olga Díaz^b,
Franco Pedreschi^a

^aDepartment of Chemical and Bioprocesses Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago, Chile.

^bDepartamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Tecnología de Alimentos, Universidade de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias, 27002 Lugo, Spain.

Referencia de la publicación:

Rubilar, J.F., Candia, D., Cobos, A., Díaz O., Pedreschi, F. (2016). Effect of nanoclay and ethyl-N α -dodecanoyl-L-arginate hydrochloride (LAE) on physico-mechanical properties of chitosan films. *LWT – Food Science and Technology*, 72, 206-214.

doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.057

Editorial: Elsevier Ltd.

ISSN: 0023-6438

Enlace:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816302481>



A large, light blue watermark of the USC logo is oriented diagonally across the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

DISCUSIÓN GENERAL



4. DISCUSIÓN GENERAL

Actualmente el problema de la contaminación generada por la excesiva utilización de envases para alimentos derivados del petróleo hace que se plantee la necesidad de buscar nuevos materiales de envasado respetuosos con el medio ambiente, en particular aquéllos biodegradables, comestibles o no, y procedentes de fuentes renovables. Los fabricados con ellos tienen que cumplir las funciones inherentes a cualquier envase para alimentos de materiales convencionales, como es protegerlo frente a los agentes externos (luz, gases, humedad, etc.) incluidos los microbiológicos, pero además reducir la generación de residuos contaminantes.

En la industria alimentaria se generan diversos residuos y subproductos, los cuales en muchos casos son un problema medioambiental debido a la cantidad en la que se producen y/o a su contenido en materia orgánica, aspecto muy importante si se liberan como efluente. Dos ejemplos son las proteínas del lactosuero, procedentes de la fabricación de quesos y de alta calidad biológica, y el quitosano, procedente de la industria procesadora de crustáceos, el cual es un componente catiónico obtenido de la deacetilación de la quitina; ésta es el polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. El estudio de estos dos hidrocoloides es muy interesante para su utilización como material de envasado biodegradable, por lo que se seleccionaron para desarrollar las investigaciones descritas en la presente Tesis Doctoral.

A pesar de lo mucho que se ha investigado sobre la creación de envases biodegradables, comestibles o no, lo cierto es que es muy complicado encontrar el material adecuado y, sobre todo, que cumpla con todas las exigencias en cuanto a la protección y conservación de

un alimento.

Por este motivo se ha estudiado el efecto de la utilización de diversos métodos de modificación de los hidrocoloides mencionados, como la radiación ultravioleta, el cambio del pH, la adición de antimicrobianos y de nanoarcillas, con la finalidad de mejorar las características físicas y mecánicas de las películas lo suficiente para que los envases obtenidos puedan ser candidatos a sustituir, al menos en parte, a los materiales de envasado convencionales derivados del petróleo

En este apartado se realiza una discusión integradora que da coherencia y unidad a los trabajos realizados. Como se indicó se emplearon dos hidrocoloides como base para la obtención de films. Respecto a las proteínas de lactosuero se utilizaron dos tipos de productos comerciales, un concentrado de proteínas de lactosuero (WPC) y un aislado de proteínas de lactosuero (WPI). Para la elaboración de estos films, normalmente la solución se somete a un tratamiento térmico para desnaturalizar las proteínas y así mejorar las propiedades de las películas. En los artículos 1 y 2 se recogen los resultados relativos al efecto de dos métodos diferentes para desnaturalizar las proteínas, el tratamiento ultravioleta (UV) y la modificación del pH, en las propiedades de películas de WPC. Los resultados relacionados con films de WPI sometidos a radiación UV a distintos valores de pH se presentaron en una comunicación a un congreso internacional (*2nd Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety Conference*, celebrado en Erding (Alemania) del 3 al 6 de octubre de 2017).

En cuanto a la obtención de películas de quitosano con propiedades modificadas, se realizaron dos estudios. El primero sobre el efecto de distintas dosis de radiación UV, cuyos resultados se presentaron también como comunicación en el congreso antes mencionado. El segundo investigó el efecto de la adición de una nanoarcilla (Cloisita 30B) y de un antimicrobiano (LAE) en películas de este carbohidrato; los resultados obtenidos están recogidos en el artículo 3.

Dado el carácter resumido de las comunicaciones al congreso que se mencionan, los resultados relacionados con el efecto de la radiación

UV en películas de WPI y quitosano y su discusión han sido incluidos en este apartado.

4.1. PELÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO MODIFICADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y ALCALINIZACIÓN

Los estudios efectuados con proteínas de lactosuero se dividen en tres partes; en todos ellos se aplicó radiación UV. En los dos primeros se empleó un concentrado de proteínas de lactosuero, mientras que en el último se utilizó un aislado de proteínas de lactosuero. El primer paso fue determinar la dosis de radiación UV y el momento de aplicación que inducía mayores cambios en las películas de proteínas de suero a partir de WPC (Artículo 1). Después, una vez seleccionada la dosis más adecuada y el momento de aplicación, se investigó el efecto del pH combinado o no con la radiación UV en los films de WPC (Artículo 2). Dado que existe en el mercado otro producto de proteínas de lactosuero, los aislados, se consideró interesante comparar los efectos inducidos por la radiación UV y el pH en películas elaboradas con WPI con aquéllos obtenidos al emplear WPC, con el fin de determinar cuál de estos productos resultaría más adecuado.

En la primera parte (Artículo 1) se estudió el efecto de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV (0,12, 4 y 12 J cm⁻²), bien en la solución proteica formadora de películas o bien en el film preformado, y se comparó con los cambios inducidos por el tratamiento térmico de la solución proteica. También se obtuvieron películas no sometidas a ningún tratamiento. Los parámetros estudiados fueron los cambios estructurales inducidos en las proteínas [concentración de grupos sulfhidrilos libres, grado de agregación y desnaturalización en las soluciones formadoras, y cambios en la estructura secundaria mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en los films] y las propiedades de los films (propiedades mecánicas, grosor, permeabilidad al vapor de agua, extracto seco, solubilidad en agua, color y opacidad, y microestructura por microscopía electrónica de barrido).

Respecto a los efectos sobre la estructura de las proteínas, se observó que los cambios inducidos por la radiación UV fueron

proporcionales a la dosis empleada y diferentes a los del tratamiento térmico aplicado (80°C, 20 min). Los cambios producidos por el calor fueron mucho más intensos, con un incremento muy importante de la concentración de grupos sulfhidrilos y la formación de agregados insolubles y de gran tamaño, unidos sobre todo por enlaces disulfuro. La técnica aplicada para el estudio de la agregación fue SE-HPLC, con lo que, al ser preciso filtrar la muestra antes de inyectarla en el equipo, en este caso los agregados quedaron retenidos en el filtro. Por lo tanto solamente se pudieron separar aquéllos que eran solubles y de pesos moleculares menores (Artículo 1, figura 1). La radiación UV, especialmente a la dosis más elevada (12 J cm⁻²), indujo la desnaturalización y posterior agregación de las proteínas. Dicha desnaturalización se reflejó en un incremento de los grupos sulfhidrilo libres, atribuido a la fotoexcitación del triptófano y la rotura de enlaces S-S (Kristo et al., 2012), aunque dicho aumento, aun siendo significativo, fue mucho menos importante que el producido por el calor (Artículo 1, tabla 1). Los agregados generados por la radiación UV fueron solubles y de menor tamaño que los producidos por el calor, y la unión entre ellos probablemente se deba en parte a la formación de enlaces disulfuro y no covalentes, por ejemplo interacciones hidrofóbicas (Ishizaki et al., 1994). Por otro lado se sabe que los dobles enlaces y los anillos aromáticos de algunos aminoácidos, tales como tirosina, fenilalanina y triptófano, absorben la radiación UV, conduciendo a la formación de radicales libres en ellos; este hecho puede conducir a la formación de enlaces covalentes intermoleculares entre los radicales de residuos aromáticos (Masutani et al., 2014). Entre estos aminoácidos, el triptófano es probablemente el principal responsable, ya que posee el coeficiente de absorción más elevado a la longitud de onda UV empleada (254 nm).

Las diferencias en cuanto a la desnaturalización proteica entre el tratamiento térmico y la radiación UV se observaron también cuando se evaluó el grado de la misma y la participación de las dos principales proteínas, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, en la formación de los agregados solubles (Artículo 1, tabla 1). En las soluciones calentadas, la mayoría de estas proteínas probablemente formaron agregados insolubles y solamente una pequeña proporción

de ellas permaneció en forma soluble y sin agregar. La β -lactoglobulina nativa residual soluble se encontró en una proporción inferior a la de α -lactoalbúmina, lo que quiere decir que se vio más afectada por la desnaturalización y posterior agregación. La radiación UV afectó de forma diferente a estas dos proteínas, modificación que se produjo con las dos dosis más elevadas. La α -lactoalbúmina se desnaturalizó con una dosis más baja (el cambio se observa ya a 4 J cm^{-2}) y con más intensidad que la β -lactoglobulina. El efecto en la desnaturalización proteica de la radiación UV a la dosis más elevada podría compararse en estos aspectos a la que otros autores (de la Fuente et al., 2002; Kazmierski y Corredig, 2003) han descrito cuando se aplican a proteínas de lactosuero tratamientos térmicos a baja temperatura (menor de 75°C).

Los resultados obtenidos en varias de las propiedades de las películas que se evaluaron pueden relacionarse con el grado de agregación de las proteínas en las soluciones formadoras de films. El tratamiento con radiación UV fue más efectivo cuando se aplicó a ellas y no a los films preformados, por lo que se concluyó que era el momento de aplicación más adecuado (Artículo 1, tablas 3, 4 y 5).

La formación de enlaces covalentes intermoleculares entre aminoácidos aromáticos se ha relacionado con el aumento de la resistencia a la tracción que produce la radiación UV en films de diversas proteínas (Gennadios et al., 1998; Rhim et al., 1999). Respecto a las propiedades mecánicas de los films (Artículo 1, tabla 3), el tratamiento de la solución proteica con la dosis más alta de radiación UV, 12 J cm^{-2} (films SUV 12.0) incrementó de forma significativa la resistencia a la tracción (TS), el módulo elástico (EM), la resistencia a la perforación (PS) y la deformación a la punción (PD); la elongación a la rotura (EB) fue menor respecto a los films no tratados y en general para los tratados a dosis inferiores en las mismas condiciones. Esto quiere decir que estas películas fueron más fuertes y menos extensibles. Su resistencia a la tracción fue similar a la de las películas de proteínas tratadas térmicamente, pero posiblemente se precisen niveles más elevados de desnaturalización y agregación para que las otras propiedades mecánicas sean comparables a las de éstas.

Otras propiedades, como el grosor, la solubilidad, el color y la

microestructura se vieron afectadas significativamente por el tratamiento UV de las soluciones a la dosis más elevada. Todas ellas se pueden relacionar con diferencias en la agregación y en los enlaces formados. La solubilidad más baja se observó en las películas de proteínas tratadas por el calor, lo cual se ha relacionado con la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre las moléculas proteicas (Pérez-Gago, 2012). Los films SUV 12.0 también fueron más insolubles que los de proteínas no tratadas o las sometidas a dosis inferiores, aunque menos que las tratadas térmicamente. En este caso el descenso de la solubilidad se debería a un incremento de la hidrofobicidad superficial por exposición de regiones hidrofóbicas tras la desnaturalización y a la formación de enlaces covalentes distintos a los disulfuro, principalmente entre los aminoácidos aromáticos (Rhim et al., 1999, 2000; Kristo et al., 2012; Schmid et al., 2015), como ya se mencionó respecto a la agregación.

En cuanto al color, los films SUV 12.0 fueron significativamente más oscuros, verdosos (menores valores de L^* y a^*) y más amarillos (mayor b^*) que el resto de las películas evaluadas. El color más amarillento de los films tratados con UV ha sido descrito por otros autores en películas de otras proteínas, como proteína de soja, de clara de huevo, gluten de trigo o caseinato sódico (Gennadios et al., 1998; Rhim et al., 1999), aunque no hay una explicación clara sobre el origen de este cambio de color. Se ha sugerido que puede deberse a un subproducto de la reacción de entrecruzamiento en el cual estaría implicado un azúcar a través de la glicación de la proteína (Masutani et al., 2014), lo cual sería posible dado que el WPC empleado contiene lactosa, o también por la formación de enlaces dobles conjugados (Schmid et al., 2015).

El estudio de la microestructura por SEM (Artículo 1, figura 3) permitió observar el mayor grado de agregación en las películas de proteínas tratadas térmicamente y en las SUV 12.0. El calor indujo la formación de agregados de diferentes tamaños unidos por cadenas gruesas debidas a la desnaturalización proteica. La radiación UV aplicada en solución dio lugar a aglomerados irregulares, con cierta similitud con los observados en los films de proteínas calentadas pero con una estructura menos densa que la de estos. Estos agregados no se

observaron en las películas no tratadas y sólo en pequeña cantidad en las tratadas con UV preformadas. Estas observaciones podrían correlacionarse con los resultados de la evaluación de las propiedades de los films y del grado de desnaturalización-agregación de las soluciones formadoras de películas. La radiación UV aplicada en los films preformados no modificó sus propiedades mecánicas ni su solubilidad respecto a las de los no tratados; probablemente se debió a que la radiación no fue capaz de penetrar lo suficiente para modificarlas, pero también porque ya existían fuertes interacciones proteicas formadas durante el secado de las películas. En cambio, al aplicar el tratamiento sobre las soluciones proteicas y a la dosis más alta sí se produjo una desnaturalización y agregación suficiente para afectar a las propiedades de los films. Estas modificaciones se pudieron observar en la estructura terciaria de las proteínas, pero no en la secundaria según los resultados obtenidos del estudio de los films mediante FTIR (Artículo 1, figura 2). En este caso no se detectaron diferencias entre los espectros de las muestras sin tratar, tratadas térmicamente ni tratadas por ultravioleta. Las modificaciones producidas por la fase de secado durante la preparación de las películas en la estructura secundaria de las proteínas probablemente enmascararon los cambios producidos por los tratamientos (Lefèvre et al., 2005), por lo que las diferencias que se observaron en las propiedades de los films no pueden atribuirse al efecto de los mismos en dicha estructura.

De acuerdo con los resultados obtenidos se abordó la segunda parte de esta investigación (Artículo 2). Así, se seleccionó la dosis más elevada de radiación UV, 12 J cm^{-2} , y la aplicación de la misma a las soluciones proteicas, dado que son las condiciones que permitían obtener películas con propiedades más modificadas. En el primer artículo, siempre se había trabajado a pH ajustado a 7. En esta segunda parte se investigó el efecto de la alcalinización de las soluciones proteicas, las cuales fueron ajustadas a dos valores de pH (9 y 11) combinada o no con la radiación UV en los films de WPC. Además se elaboraron films a partir de soluciones a pH 7, tratadas o no con radiación UV, los cuales actuaron como controles. Se efectuaron las mismas determinaciones analíticas que en la investigación descrita en

el Artículo 1.

El pH de las soluciones tiene una gran importancia en las propiedades de las películas a las que dan lugar. Los valores de pH alcalinos, alejados del pI de las proteínas, producen desnaturalización, desplegamiento y solubilización, lo que expone grupos cargados negativamente que se repelen entre sí y modifican la estructura de las cadenas proteicas. Todo esto conduce a la formación de enlaces S-S intermoleculares, de interacciones no covalentes y de polimerizaciones (Bourtoom et al., 2006). En films de proteínas de suero sin tratar a pH alcalino las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno son importantes, mientras que los enlaces disulfuro, muy relevantes en los films de proteínas tratadas térmicamente, son menos decisivos en su formación (Quinn et al., 2003). Existen numerosos estudios sobre los efectos conjuntos de la modificación del pH y el tratamiento térmico sobre las propiedades de los films (Gennadios et al., 1993; Anker et al., 2000; Bourtoom et al., 2006; de la Caba et al., 2012; Jiang et al., 2012), pero no sobre la combinación de la alcalinización y el tratamiento con radiación UV hasta el momento de inicio de esta Tesis Doctoral.

Tanto la alcalinización como la aplicación de radiación UV de las soluciones formadoras de películas modificaron las propiedades de los films de WPC y se observaron interacciones entre ambos tratamientos en la mayoría de los parámetros evaluados.

La radiación UV incrementó la agregación respecto a las soluciones sin tratar a todos los valores de pH. El contenido en polímeros y oligómeros (Artículo 2, tabla 1) fue mayor en las soluciones a pHs alcalinos, aunque la proporción entre unos y otros varió en función del pH; a pH 11 la acción conjunta de ambos agentes desnaturalizantes produjo una agregación más intensa, con la formación de agregados de mayor peso molecular (polímeros), disminuyendo como consecuencia la de oligómeros en relación a las soluciones a pH 9. Esta observación concuerda con el mayor descenso del contenido de grupos sulfhidrilo libres en las soluciones a pH 11, probablemente debido a la formación de agregados unidos por enlaces S-S, dado que las reacciones de intercambio disulfuro se ven facilitadas a valores elevados de pH (Tanford, 1968).

Sin embargo se observaron diferencias en el grado de afectación de las dos principales proteínas del lactosuero. La intensidad del efecto de la radiación UV en la proteína del lactosuero bovino más abundante, la β -lactoglobulina, fue distinta en función del pH de las soluciones. El efecto del tratamiento UV fue mayor a pH 7 y 9; en cambio, el grado de desnaturalización de esta proteína debido a condiciones de alta alcalinidad (pH 11) fue muy elevado y la radiación UV solamente la incrementó ligeramente. La desnaturalización de esta proteína fue más intensa a pH 11 que la de la α -lactoalbúmina, y probablemente fue la β -lactoglobulina la que participó en mayor cuantía en la formación de polímeros. En el caso de las soluciones proteicas a pHs 7 y 9, el comportamiento de la α -lactoalbúmina podría ser comparable al de los tratamientos térmicos a baja y alta temperatura, respectivamente (de la Fuente et al., 2002; Kazmierski y Corredig, 2003); a pH neutro esta proteína se desnaturalizó en mayor proporción que la β -lactoglobulina, mientras que el grado de desnaturalización a pH 9 fue similar (Artículo 2, tabla 1, valores de proteínas residuales y relación β -lactoglobulina/ α -lactoalbúmina).

La solubilidad de los films (Artículo 2, tabla 2) se vio afectada por la interacción de los dos tratamientos desnaturalizantes y puede ser modificada para obtener films con diferentes propiedades. El tratamiento ultravioleta disminuyó la solubilidad a pH 7 mientras que la aumentó a pHs 9 y 11. La alcalinización de las soluciones causó la desnaturalización de las proteínas antes del tratamiento UV; estos resultados pudieron deberse a que interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno que se formaron entre las proteínas en dichas condiciones se rompieran por acción de la radiación UV. Como consecuencia, es posible que se produjera la exposición de grupos hidrofílicos y esto pudo incrementar las interacciones proteína-agua y la solubilidad de los films.

El tratamiento UV de las soluciones a pHs 7 y 9 produjo películas más fuertes (mayor fuerza tensil) y resistentes a la punción que las procedentes de soluciones no tratadas, especialmente en el caso de los films de soluciones a pH 9 (Artículo 2, tabla 3). Sin embargo, a pH 11 el grado de desnaturalización y agregación inducido en las proteínas por la alta alcalinización fue tan intenso que la radiación UV no

mejoró las propiedades mecánicas de los films. La elasticidad de los mismos, reflejada en los resultados de la elongación a la rotura, disminuyó al aplicar el tratamiento en las soluciones a pH alcalino. Estos efectos en la fuerza y en la elasticidad han sido atribuidos por otros autores (Gennadios et al., 1998) a la formación de una estructura proteica más rígida y densa, la cual se pudo corroborar en el estudio de la microestructura de los films por SEM (Artículo 2, figura 2). La alcalinización produjo un incremento de la presencia de agregados formando una estructura compacta, más densa en el caso de las muestras a pH 11 en las que además aparecen unas estructuras grandes y lisas ausentes en las otras películas. Esto se puede relacionar también con la mayor formación de polímeros observada en las soluciones correspondientes (Artículo 2, tabla 1).

Ambos tratamientos modificaron el color de las películas (Artículo 2, tabla 4). El tratamiento UV de las soluciones a pH 11 dio lugar a films más amarillos (aumentó el valor de la coordenada b^*) y con una diferencia de color total (ΔE) mayor que las películas de soluciones a pHs 7 y 9. Las reacciones de Maillard son probablemente las responsables de estos cambios, dado que se intensifican en las mezclas de proteínas y azúcares reductores tanto por las condiciones alcalinas como por la acción de la radiación UV (Whitaker y Feeney, 1983; Masutani et al., 2014).

Otro de los productos con alta concentración de proteínas de suero que se comercializan son los aislados de proteínas de lactosuero (WPI). Estos aislados poseen mayor contenido en proteína y, en consecuencia, menor del resto de componentes, lo cual puede ocasionar un comportamiento diferente al de los concentrados cuando se emplean en la obtención de películas, como ya se mencionó en la Introducción de esta Tesis Doctoral (apartado 1.6. *Films de proteínas de lactosuero*). Por esta razón se consideró interesante evaluar las propiedades de films obtenidos con WPI a partir de soluciones ajustadas a valores de pH alcalinos (9 y 11) y sometidas a un tratamiento de radiación UV, y comparar los resultados con aquellos obtenidos a partir de WPC (Artículo 2). Dichos resultados fueron presentados en la siguiente comunicación:

Díaz, O. Candia, D., Cobos, A. (2017). Whey protein isolate

based films as affected by pH and ultraviolet radiation. 2nd *Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety Conference*. Póster P035. Erding (Alemania). 3-6 octubre.

La metodología empleada en la obtención de las películas fue similar a la utilizada en la preparación de las elaboradas con WPC (ver Artículo 2), aunque la composición del producto inicial era diferente. Se partió del aislado de proteínas de suero (WPI) “Isolate whey 90” suministrado por Armor Protéines (Saint-Brice en Cogless, Francia). De acuerdo con el fabricante, la composición del producto era 91% de proteína, 4% de humedad, 0,5 % de grasa, 2 % de lactosa y 2,5% de cenizas. Se prepararon soluciones conteniendo un 8% (p/p) de proteína en agua desionizada efectuando una agitación lenta durante 30 min a 20°C para evitar la formación de espuma; después se añadió glicerol como plastificante en una proporción 2:1 (proteína:plastificante) y se ajustó el pH a 7, 9 u 11 con NaOH 2M. Después se agitaron otros 30 min y se vertieron en placas Petri (8,5 cm de diámetro interno) volúmenes de las soluciones conteniendo 1,2 g de sólidos totales por placa. Posteriormente se aplicó a las soluciones proteicas la dosis UV más alta de entre las utilizadas en los experimentos anteriores con WPC (12 J cm⁻²). A continuación se secaron en estufa de aire forzado a 50°C y se almacenaron a 20°C y 50% de humedad relativa durante 72 h. Se elaboraron también películas no tratadas. A continuación se describen los resultados obtenidos y las diferencias encontradas entre las muestras tratadas con radiación UV y las no tratadas, así como las diferencias con las películas obtenidas con WPC. Todos los experimentos se hicieron por triplicado, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) para determinar la significancia estadística entre las medias de cada valor de pH en cada grupo usando las diferencias menos significativas con significancia a $p < 0,05$. La comparación de medias de cada tratamiento dentro del mismo pH se realizó utilizando t-test para muestras independientes con una significancia de $p < 0,05$.

El efecto del pH en las películas no tratadas fue muy importante, ya que sólo fue posible despegarlas de las placas y, por lo tanto, analizarlas cuando el pH de la solución formadora se había ajustado a 11; por ello no se obtuvieron resultados de las películas no tratadas de

soluciones a pHs 7 y 9 y por tanto no aparecen en las tablas incluidas en esta sección. Esto se puede atribuir a un desplegamiento muy intenso de las moléculas proteicas a pH 11, que expone grupos inaccesibles en la forma nativa y permite la formación de agregados. La extensión de la polimerización pH-dependiente y particularmente a pH 11 ha sido observada por otros autores (Monahan et al., 1995) y en esta Tesis Doctoral en la investigación sobre el efecto de este factor en films de WPC recogida en el Artículo 2. La imposibilidad de despegar las películas de WPI de soluciones sin tratar a pH 7 y 9 contrasta con los resultados con WPC, en las que no existió este problema. Esta diferencia podría atribuirse al mayor contenido en compuestos no proteicos en el WPC, como la lactosa o los lípidos (9 y 3,5%, respectivamente), los cuales pudieron mejorar el comportamiento de los films ya que actúan en ellos como plastificantes (Sothornvit y Krochta, 2005; Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008). El tratamiento con radiación UV permitió que fuera posible despegar estas películas de las placas y efectuar los análisis, probablemente debido a que esta radiación es capaz de inducir la formación de enlaces intermoleculares covalentes e interacciones no covalentes (Rhim et al., 1999), lo que las hizo más resistentes a la manipulación durante la separación del soporte.

Los resultados obtenidos en el análisis de las películas de WPI se recogen en las tablas 4.1 (permeabilidad al vapor de agua, extracto seco, grosor y solubilidad en agua), 4.2 (propiedades mecánicas) y 4.3 (parámetros de color).

Respecto al efecto de la radiación UV en los parámetros analizados, solo fue posible observarlo en las películas a partir de soluciones a pH 11 por las razones explicadas anteriormente. En los films tratados se observaron descensos significativos en el grosor (Tabla 4.1), la elongación a la rotura, la resistencia a la perforación, la deformación a la punción (Tabla 4.2) y la luminosidad (Tabla 4.3), mientras que los parámetros de color b^* y ΔE mostraron incrementos significativos (Tabla 4.3). Estos efectos se observaron también en las películas de WPC en las mismas condiciones (Artículo 2, tablas 3 y 4). Los resultados obtenidos en el grosor y las propiedades mecánicas podría deberse al incremento en las interacciones moleculares a través

de enlaces disulfuro y a la formación de una estructura más densa y rígida, que hizo a los films tratados con UV menos extensibles (Gennadios et al., 1998). En cuanto a los parámetros de color, según los cuales las películas fueron menos luminosas y más amarillas, podría atribuirse a las mismas razones citadas para los films de WPC.

Al comparar los films tratados con radiación UV entre sí se observa que la alcalinización modificó significativamente diversos parámetros. Se encontraron diferencias en la solubilidad en agua, existiendo un aumento en las películas de soluciones alcalinas aunque solo fue significativo en los films a pH 9. Probablemente el tratamiento UV pudo romper enlaces no covalentes entre las proteínas, lo que podría haber expuesto grupos hidrofílicos, incrementar las interacciones proteína-agua y así aumentar la solubilidad. Un comportamiento similar se observó en los films de WPC (Artículo 2, tabla 2). En lo que respecta a las propiedades mecánicas, la alcalinización aumentó la elongación a la rotura, la resistencia a la perforación y la deformación a la punción, es decir, estas películas fueron más elásticas que las obtenidas de soluciones a pH 7. Este comportamiento fue similar al observado en películas de WPC en lo que se refiere a la pruebas de punción. La luminosidad descendió y la coordenada b^* y ΔE aumentaron significativamente en los films de soluciones a pH 11, lo que implica que fueron menos luminosos y más amarillos que los demás. Este efecto se debe probablemente a que las reacciones de Maillard son más intensas a pH alcalino, tal y como observaron otros autores (Whitaker y Feeney, 1983).

Cuando se comparan los efectos de la radiación UV en las películas de WPI con lo observado en las de WPC obtenidas en las mismas condiciones se puede decir que son similares, siempre teniendo en cuenta que solo puede hacerse entre films de soluciones a pH 11. El efecto del pH tiene también una tendencia bastante semejante en ambos tipos de films. Si se comparan los valores medios de los films tratados de WPI con los de WPC se observan cifras más elevadas de la permeabilidad al vapor de agua, la resistencia a la tracción (fuerza tensil) y la resistencia a la perforación, así como una menor elasticidad de las películas de WPI. Estas diferencias pueden atribuirse al mayor contenido en lípidos del WPC; su naturaleza no

polar proporciona una mayor barrera frente a la migración de agua en los films, lo cual reduce la permeabilidad al vapor de agua. Incorporados a los films basados en proteínas ejerce un efecto plastificante, que reduce la fuerza de las películas y aumenta su flexibilidad (Sothornvit y Krochta, 2005). Otros factores como el contenido en calcio, que puede afectar al grado de agregación de las proteínas en los films de proteínas de suero y, por lo tanto, a sus propiedades (Ramos et al., 2013) no es en este caso importante, dado que el contenido de calcio del WPI y WPC utilizados en los experimentos fueron similares (430 y 400 mg/100 g de producto).

En lo que se refiere a los parámetros de color, las mayores diferencias se observaron en las coordenadas a^* y b^* y en la diferencia de color. Los films de WPI tratados con radiación UV fueron más verdosos y menos amarillos (menores valores de a^* y b^*) que los de WPC. Esto apoyaría la explicación que relaciona la intensificación del color amarillo con la radiación UV debido al incremento en las reacciones de Maillard citado anteriormente. Otros autores (Ramos et al., 2013) lo han atribuido también a la mayor presencia de lípidos, aunque no explican el mecanismo.



Tabla 4.1. Transmisión y permeabilidad al vapor de agua, extracto seco, grosor y solubilidad de películas de WPI tratadas con radiación UV.

		pH		
Parámetro		7	9	11
Transmisión del vapor de agua				
(g h ⁻¹ m ⁻²)	No tratado			23,68±1,56
	Tratado con UV	25,38±1,71	24,04±0,41	24,63±1,67
Permeabilidad al vapor de agua				
(g mm kPa ⁻¹ h ⁻¹ m ⁻²)	No tratado			1,41±0,12
	Tratado con UV	1,40±0,08	1,35±0,08	1,28±0,02
Grosor (μm)	No tratado			x138,0±4,58
	Tratado con UV	129,3±1,53	131,3±5,13	y121,3±5,86
Extracto seco (g/100g)	No tratado			75,97±1,26
	Tratado con UV	75,63±0,16	75,56±0,80	75,64±0,77
Solubilidad (% extracto seco)	No tratado			53,84±9,79
	Tratado con UV	62,03±5,10a	91,62±5,86b	71,33±11,77a

a, b: medias con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (p<0,05).

x, y: medias con diferentes letras en la misma columna dentro de cada parámetro son significativamente diferentes (p<0,05).

Tabla 4.2. Propiedades mecánicas de las películas de WPI tratadas con radiación ultravioleta.

Parámetro	pH		
	7	9	11
Resistencia a la tracción al máximo (MPa)			
No tratado			3,97±0,63
Tratado con UV	3,72±0,70	2,52±0,43	3,56±1,09
Elongación a la rotura (%)			
No tratado			x39,61±2,28
Tratado con UV	13,81±4,28a	15,56±4,58a	y24,34±2,95
Módulo elástico (N mm⁻¹)			
No tratado			2,91±0,12
Tratado con UV	3,07±0,26	3,07±0,64	2,83±0,06
Resistencia a la perforación (MPa)			
No tratado			x3,65±0,15
Tratado con UV	2,86±0,02a	3,17±0,10b	y3,22±0,18b
Deformación a la punción (%)			
No tratado			x7,00±0,40
Tratado con UV	4,07±0,19a	5,02±0,40b	y5,56±0,21b

a, b: medias con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

x, y: medias con diferentes letras en la misma columna dentro de cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 4.3. Parámetros de color y opacidad de las películas de WPI tratadas con radiación UV.

Parámetro		pH		
		7	9	11
L*	No tratado			x93,91±0,33
	Tratado con UV	92,99±0,22a	92,93±0,20a	y90,83±0,41b
a*	No tratado			-1,90±0,05
	Tratado con UV	-1,38±0,08	-1,53±0,01	-1,61±0,33
b*	No tratado			x8,30±0,41
	Tratado con UV	8,63±0,17a	9,12±0,37a	y16,77±1,10b
ΔE	No tratado			x7,30±0,49
	Tratado con UV	7,86±0,27a	8,34±0,40a	y16,19±1,18b
Opacidad	No tratado			10,90±1,18
	Tratado con UV	11,02±0,56	11,53±1,63	12,71±1,71

a, b: medias con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

x, y: medias con diferentes letras en la misma columna dentro de cada parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2. PELÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE QUITOSANO

El quitosano es un compuesto catiónico obtenido por deacetilación de quitina, que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos. Es un compuesto biodegradable, biofuncional, no tóxico, biocompatible, comestible, de apariencia estética, una buena barrera para elementos externos (bacterias, humedad, vapor de agua...) y por estas razones puede aumentar la vida útil del producto (Zivanovic et al., 2005).

Con la finalidad de obtener películas de quitosano con mejores

propiedades físico-mecánicas, se realizaron dos tipos de experiencias. En la primera se estudió el efecto de un tratamiento físico, la radiación ultravioleta, aplicado sobre las soluciones formadoras de films. En la segunda (en la que se colaboró con investigadores de la Pontificia Universidad Católica de Chile) se adicionaron una nanoarcilla y un antimicrobiano a las soluciones de quitosano en distintas proporciones.

La radiación UV ejerce un efecto de fotodegradación sobre el quitosano mediante un mecanismo de acción al parecer semejante al de la celulosa, carbohidrato con el que presenta similitud estructural. Dicho mecanismo incluye la escisión de la cadena principal del polímero debida a la fotólisis de enlaces glicosídicos y la rotura del anillo de piranosa (Andrady et al., 1996), con producción de grupos hidroxilo y formación de grupos carboxílicos en presencia de oxígeno (Praxedes et al., 2012). Las soluciones de quitosano tratadas con radiación UV presentan un descenso de la viscosidad y el peso molecular medio, con formación de nuevos cromóforos; en films de quitosano se han observado cambios microestructurales en su superficie y un descenso de su rugosidad (Sionkowska et al., 2006, 2013). No hay demasiada información sobre el efecto en las propiedades de films de quitosano tratados con distintas dosis de radiación UV, y la que está disponible realiza el tratamiento sobre films preformados (Sionkowska et al., 2015). Sionkowska et al. (2013) concluyen que la fotodegradación del quitosano en solución se produce más rápido que la de los films del mismo, aunque al igual que en el artículo anterior no efectúan una comparación entre tratamientos antes y después de la obtención de películas. Por lo tanto el tratamiento con radiación UV de las soluciones previamente a la obtención de los films podría modificar sus características.

El etil lauroil arginato o LAE es un derivado del ácido láurico, la L-arginina y el etanol. Este compuesto destaca por su capacidad antimicrobiana frente a bacterias Grampositivas, Gramnegativas y mohos. No aporta color, sabor ni olor a la película y es fácilmente metabolizado por el cuerpo humano tras su consumo (Higueras *et al.*, 2013). Las nanoarcillas se utilizan en la fabricación de las películas ya que disminuyen la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, así

como también mejoran la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas de los films. Además dispersan la radiación visible y UV, protegiendo así el alimento del efecto negativo de la luz solar (Sánchez-García y Lagaron, 2012). Sin embargo, y pese a las ventajas que podrían tener ambos en el desarrollo de un material de envasado activo basado en el quitosano, no se habían combinado y estudiado su efecto conjunto ni las interacciones con el polímero en las propiedades físico-mecánicas de films previamente a la investigación recogida en el Artículo 3.

4.2.1. Efecto del tratamiento con radiación ultravioleta en las propiedades de las películas de quitosano

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron presentados en una comunicación en un congreso internacional:

Díaz, O. Candia, D., Cobos, A. (2017). Effect of ultraviolet radiation on chitosan film properties. *2nd Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety Conference*. Póster P027. Erding (Alemania). 3-6 octubre.

Para la preparación de la solución formadora de las películas de quitosano se disolvieron 20 g/L de quitosano (Sigma Aldrich) en una solución de ácido acético glacial con una concentración de 10 ml/L y se homogeneizó a 11.000 rpm en un equipo Ultra Turrax; después se dejó reposar 12 h a temperatura ambiente, filtrándola a continuación. Posteriormente se calentó a 40°C y se añadió glicerol (0,5 g/g quitosano) como plastificante, efectuando un mezclado en un agitador magnético durante 30 min. Tras esto las soluciones se desgasificaron a vacío y se vertieron en placas, a razón de 15 g de solución por cada placa Petri de 9 cm de diámetro.

En esta investigación se estudió el efecto en las propiedades de las películas de diferentes dosis de radiación UV aplicadas sobre la solución formadora ya distribuida en placas Petri. Estas dosis fueron de 1, 2 y 4 J cm⁻² (películas SUV 1,0, SUV 2,0 y SUV 4,0, respectivamente), las cuales se decidieron de acuerdo con los resultados obtenidos en pruebas previas como capaces de inducir cambios en los films. El equipo empleado fue el mismo que se detalla en los Artículos 1 y 2. Tras el tratamiento se procedió a su secado en una estufa de convección a 35°C durante 17 h y a continuación las

placas con las películas se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente y 50% de humedad relativa durante 48 h hasta su análisis. También se elaboró un lote control sin tratar. Todos los experimentos se hicieron por triplicado, aplicando las metodologías recogidas en el Artículo 1, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los tratamientos ($p < 0,05$). Las tablas 4.4, 4.5 y 4.6 recogen los resultados obtenidos en los parámetros fisicoquímicos, propiedades mecánicas y color respectivamente, así como las diferencias encontradas entre las muestras tratadas y las no tratadas.

La aplicación de radiación UV a las soluciones formadoras de films sólo afectó a algunos parámetros, observándose diferencias significativas respecto a las películas no tratadas en solubilidad, fuerza tensil y elongación a la rotura. El tratamiento UV redujo la solubilidad de los films significativamente cuando se aplicaron dosis de 2,0 y 4,0 respecto a los no tratados. Respecto a las propiedades mecánicas, la fuerza tensil disminuyó con todas las dosis, mientras que la elongación a la rotura sólo aumentó cuando se aplicaron $2,0 \text{ J cm}^{-2}$. Esto implica que las películas fueron menos fuertes en todos los casos y solamente se hicieron más flexibles cuando se sometieron en solución a esta última dosis. Sionkowska et al. (2015), en films preformados tratados con radiación UV, observaron también un descenso de la fuerza tensil, lo que atribuyen a la degradación de las películas. La radiación UV produce roturas de la cadena de biopolímero pero simultáneamente se originan entrecruzamientos entre las cadenas de los que podrían ser responsables radicales libres muy activos (Sionkowska et al. 2013); el incremento del porcentaje de elongación a la rotura cuando se aplicó una dosis de 2 J cm^{-2} podría atribuirse a una modificación en el balance de rotura-entrecruzamiento de las cadenas de quitosano.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento con radiación UV no aporta mejoras a las propiedades de las películas de quitosano al menos en las condiciones en que se aplicó.

Tabla 4.4. Permeabilidad al vapor de agua, materia seca, grosor y solubilidad de las películas de quitosano tratadas con radiación ultravioleta

Parámetro	Sin tratar	SUV 1,0	SUV 2,0	SUV 4,0
Transmisión del vapor de agua (g h ⁻¹ m ⁻²)	20,76±0,78	20,71±0,68	21,06±1,79	20,89±1,97
Permeabilidad al vapor de agua (g mm kPa ⁻¹ h ⁻¹ m ⁻²)	0,56±0,04	0,54±0,02	0,57±0,06	0,53±0,04
Grosor (μm)	63,11±1,86	61,82±0,35	63,22±4,87	59,96±1,01
Extracto seco (g/100g)	66,11±2,80	65,68±2,74	62,25±3,57	64,62±1,69
Solubilidad (% extracto seco)	36,60±5,76a	31,53±5,15ab	23,86±1,50b	26,93±4,55b

a, b: medias con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (p<0,05).

Tabla 4.5. Propiedades mecánicas de las películas de quitosano tratadas con radiación ultravioleta

Parámetro	Sin tratar	SUV 1,0	SUV 2,0	SUV 4,0
Fuerza tensil al máximo (MPa)	24,22±1,87a	20,26±0,37b	19,66±1,90b	19,64±0,72b
Elongación a la rotura (%)	38,72±3,08b	36,74±5,00b	49,35±7,19a	35,62±1,09b
Resistencia a la perforación (MPa)	18,32±3,53	18,47±2,34	18,39±2,87	17,24±2,64
Deformación a la punción (%)	21,00±4,58	22,29±2,83	25,23±4,81	22,20±2,38

a, b: medias con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (p<0,05).

Tabla 4.6. Parámetros de color CIELab, diferencia de color y opacidad de las películas de quitosano tratadas con radiación ultravioleta en solución.

Parámetro	Sin tratar	SUV 1,0	SUV 2,0	SUV 4,0
L*	88,33±1,04	88,10±1,22	87,07±0,17	87,70±1,27
a*	-1,26±0,09	-1,33±0,17	-1,40±0,10	-1,46±0,17
b*	9,01±2,25	8,60±2,39	8,98±2,39	9,05±2,57
ΔE	11,02±2,18	10,89±2,44	11,92±1,07	11,53±2,62
Opacidad	13,99±2,14	13,78±2,73	12,93±2,68	13,92±2,66

4.2.2. Efecto de la adición de nanoarcilla y de LAE en las propiedades de las películas de quitosano.

Esta investigación surgió de una colaboración con los investigadores Javiera F. Rubilar y Franco Pedreschi del Departamento de Ingeniería Química y de Bioprocesos de la Pontificia Universidad Católica de Chile y se desarrolló por entero en los laboratorios de la Facultad de Ciencias del Campus de Lugo de la Universidade de Santiago de Compostela. La Dra. Javiera F. Rubilar pudo realizar su estancia en Lugo gracias una ayuda postdoctoral financiada por CONICIT (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile) y la propia Universidad chilena. Esta colaboración permitió a la autora de esta Tesis Doctoral avanzar en el estudio de la modificación de las propiedades físico-mecánicas de los films de quitosano mediante la adición de una nanoarcilla, la Cloisita 30B, y en el efecto en dichas propiedades de la incorporación de un conservante, el LAE, con objeto de mejorar las propiedades antimicrobianas del quitosano. Hasta el momento del desarrollo de este estudio no se conocía si la adición del antimicrobiano podía modificar las propiedades y microestructura de los films de quitosano con y sin nanoarcilla añadida. Con el fin de evaluar el mayor número de combinaciones en los films se llevó a cabo un diseño experimental incluyendo los dos compuestos (factores) a tres niveles de adición diferentes (Artículo 3, tabla 1). En el estudio estadístico de los resultados se incluyó un análisis gráfico de los mismos, empleando diagramas de Pareto, con objeto de determinar los efectos

significativos más importantes.

En todos los casos se obtuvieron films flexibles y transparente-translúcidos. La adición de la Cloisita 30B a la concentración de 10 g/L a los films de quitosano provocó los siguientes efectos significativos según reflejó el diagrama de Pareto: un aumento del grosor y de la opacidad y un descenso del contenido de humedad, de la solubilidad en agua y de la transmisión del vapor de agua de los films. En cuanto a las características mecánicas de las películas, causó a ese nivel de incorporación un aumento significativo de la elongación a la rotura. Se observó un descenso de la deformación a la punción sólo al añadirse 5 g/L; con esa concentración la elongación a la rotura disminuyó pero no significativamente. La incorporación de Cloisita 30B a ambos niveles de adición ocasionó un aumento de la fuerza tensil y un descenso de la resistencia a la perforación pero sin efectos significativos. Xu et al. (2006) observaron efectos similares de la adición de Cloisita 30B en films de quitosano en la fuerza tensil; encontraron un aumento de ella aunque no significativo con diferentes dosis de adición; en la elongación a la rotura también observaron efectos variables en función de la concentración añadida. La adición de Cloisita 30B no causó en nuestro trabajo un cambio significativo en la permeabilidad al vapor de agua, lo que sí suele suceder al añadir nanoarcillas a películas, ya que se ha señalado un descenso de dicha permeabilidad al adicionar MMT en films de quitosano (Abdollahi et al, 2012; Kasirga et al, 2012). Estas diferencias pueden deberse a distintos efectos de la MMT y Cloisita 30B, como Xu et al. (2006) señalan en otros parámetros.

Respecto del color, sólo en el diagrama de Pareto expuesto se observa claramente el efecto significativo de la nanoarcilla sobre la opacidad, comentado en el párrafo anterior. En los resultados de los parámetros de color analizados mediante ANOVA, las películas con nanoarcillas y sin LAE (Artículo 3, tabla 3, muestras F5 y F6) sólo mostraron un incremento significativo de L^* respecto al lote control (muestra F9), mientras que los parámetros a^* y b^* apenas se vieron modificados.

La adición de LAE a distintos niveles a los films de quitosano también afectó significativamente a algunas propiedades mecánicas

según reflejó el diagrama de Pareto. Causó un aumento significativo de la fuerza tensil y de la resistencia a la rotura de las películas. También produjo un aumento de los valores de las otras dos propiedades mecánicas estudiadas (elongación a la rotura y deformación a la punción) aunque no de una manera significativa. Por tanto, la adición de LAE mejora las propiedades mecánicas de los films, no habiéndose encontrado en la bibliografía existente motivos que expliquen dicha mejoría; ésta probablemente sea debido a que se produzcan interacciones de dicho aditivo con el quitosano.

En relación a los otros parámetros de color (Artículo 3, tabla 3), las combinaciones con LAE y sin nanoarcillas (muestras F1 y F3) mostraron un descenso significativo de a^* y un aumento significativo de b^* respecto al lote control (F9). La adición de LAE no influyó en la luminosidad (L^*).

También en el citado diagrama de Pareto se puede observar un efecto significativo de la interacción entre ambos componentes, causando dichas incorporaciones un aumento de la solubilidad en agua y un descenso de humedad y opacidad de los films. El incremento de la solubilidad puede deberse a que la mezcla de LAE y nanoarcilla produce un mayor hinchamiento que rompe las interacciones moleculares y aumenta el movimiento de las cadenas de polímeros, permitiendo una mayor interacción con las moléculas de agua (Dias et al., 2014). Esto puede relacionarse con lo observado en la microestructura por SEM, donde la película que tiene alta concentración de nanoarcilla y LAE (Fig. F4a) es menos rugosa que la que sólo tiene nanoarcilla (Fig 6a).

En el diagrama de Pareto no se observa efectos significativos de la interacción en los otros parámetros estudiados; sin embargo, en los resultados analizados mediante ANOVA sí merecen destacarse ciertos aspectos. Las mezclas de LAE y nanoarcilla mostraron resultados variables en función de la proporción de adición de estos compuestos en la mezcla. La muestra con los contenidos más elevados de LAE y nanoarcilla (F4) mostró los mayores valores de fuerza tensil y resistencia a la rotura; sin embargo, otras combinaciones de LAE y Cloisita 30B (F2, F7 y F8) presentaron valores inferiores que la adición de LAE (F3) y nanoarcilla (F6) en sus mayores proporciones,

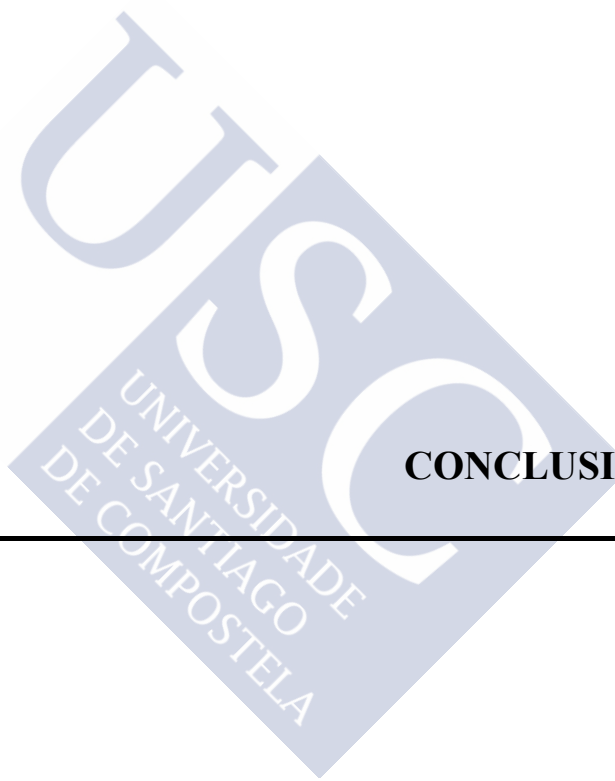
aunque sin efectos significativos (Artículo 3, tabla 4). Por tanto, se requiere emplear cantidades por encima de una concentración mínima de ambos compuestos para conseguir una interacción positiva.

En relación al color, en el caso de la adición más elevada de estos compuestos (muestra F4) predominó el efecto de la nanoarcilla (aumento significativo de la luminosidad sin diferencias significativas en a^* y b^* respecto del control).

En resumen, los films que contenían las concentraciones más altas de LAE (1 g/L) y/o nanoarcilla (10 g/L) mostraron mejores propiedades mecánicas. La adición de nanoarcilla a esta concentración también aumentó la opacidad de las películas, lo cual puede ser interesante para aplicaciones en las que se precisa proteger al alimento de la acción de la luz. No obstante, es necesario tener en cuenta que estos compuestos interaccionaron entre sí, por lo que las propiedades se vieron afectadas no solo por el hecho de combinarlos, sino también por la concentración añadida de cada uno de ellos. Es muy destacable en las propiedades mecánicas el efecto del LAE en la fuerza tensil y la resistencia a la perforación, el cual produjo un incremento de los valores de ambas propiedades. Es posible que la inclusión del LAE entre las moléculas de quitosano y su interacción con ellas sea capaz de modificar favorablemente estas propiedades; la naturaleza de dichas interacciones merece ser estudiada en investigaciones futuras.







CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

1. Para que el tratamiento con radiación ultravioleta produzca un efecto significativo en las propiedades de las películas de concentrados de proteínas de lactosuero (WPC) tiene que ser aplicado en la solución proteica a pH 7, no en los films preformados, y al menos a una dosis de 12 J cm^{-2} .
2. La radiación ultravioleta modifica las propiedades de los films de diferente manera que el tratamiento térmico. Los cambios que induce en las proteínas son menos intensos y diferentes, siendo la α -lactoalbúmina más afectada proporcionalmente que la β -lactoglobulina.
3. Dicho tratamiento a la dosis de 12 J cm^{-2} incrementa la resistencia a la tracción y a la perforación y la deformación a la punción, y disminuye la solubilidad de los films; no obstante sólo la resistencia a la tracción es similar a la de las películas donde se emplea tratamiento térmico. La modificación en el color es más intensa con esta dosis de radiación ultravioleta.
4. La aplicación conjunta de la radiación ultravioleta (dosis de 12 J cm^{-2}) con la alcalinización de las soluciones modifica las propiedades de los films de WPC, observándose interacciones en la mayoría de los parámetros. El tratamiento ultravioleta produce mayores modificaciones en las soluciones a pH 9, dando lugar a películas más resistentes a la tracción y a la perforación respecto a las no tratadas.
5. El grado de desnaturalización y agregación de las proteínas inducido por la alcalinización a pH 11 es tan intenso que el

tratamiento con radiación ultravioleta no mejora las propiedades mecánicas de los films, aunque sí modifica su color y su microestructura.

6. Por tanto, la aplicación de radiación ultravioleta o la combinación de dicho tratamiento con alcalinización puede ser útil para obtener films de WPC con propiedades adecuadas para el envasado de alimentos.

7. El tratamiento con radiación ultravioleta a la dosis de 12 J cm^{-2} de las soluciones de aislados de proteínas de lactosuero (WPI) ajustadas a valores de pH de 7 y 9 hizo posible que los films obtenidos pudieran ser despegados de las placas, cosa que no pudo conseguirse de las soluciones no tratadas. Los efectos en las películas de la radiación ultravioleta aplicada en solución de WPI a pH 11 respecto a las no tratadas al mismo pH son similares que los observados en los films de WPC.

8. Respecto a las películas de quitosano, la aplicación de radiación ultravioleta a las soluciones sólo afecta a la solubilidad y la resistencia a la tracción, que disminuyen, y la elongación a la rotura, la cual se incrementa a la dosis de $2,0 \text{ J cm}^{-2}$. En general, el tratamiento con radiación ultravioleta en las condiciones en las que se aplicó no aporta mejoras a las propiedades de los films de quitosano.

9. La adición de etil lauroil arginato (LAE) y/o nanoarcilla (Cloisita 30B) influye en las propiedades físico-mecánicas de los films de quitosano. Las propiedades de las películas se ven afectadas tanto por la interacción de ambos compuestos como por la concentración añadida de cada uno de ellos. Los films a los que se les añaden las máximas concentraciones estudiadas (1 g/L de LAE y/o 10 g/L de nanoarcilla) muestran las mejores propiedades mecánicas. La adición de nanoarcilla a esa concentración aumenta la opacidad de las películas y, por lo tanto, su potencial utilidad para proteger los alimentos de la luz. El LAE incrementa la resistencia a la tracción y a la perforación de forma significativa.



BIBLIOGRAFÍA



5. BIBLIOGRAFÍA

Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaie, M., Behrooz, R. (2013). Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, 32, 416-424.

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, G.J. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111, 343-350.

Alcantara, A.C.S., Darder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. (2012). Zein-fibrous clays biohybrid materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 5216-5224.

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.

Alexandre M., Dubois P. (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering*, 28, 1-63.

Amini, A.M., Razavi, S.M.A., Zahedi, Y. (2015). The influence of different plasticizers and fatty acids on functional properties of basil seed gum edible film. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1137-1143.

Andrady, A.L., Torikai, A., Kobatake, T. (1996). Spectral sensitivity of chitosan photodegradation. *Journal of Applied Polymer Science*, 62, 1465-1471.

Anker, M., Bernsten, J., Hermansson, A.-M., Stading, M. (2002). Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an

acetylated monoglyceride. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 81-92.

Anker, M., Stading, M., Hermansson, A.-M. (2000). Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3806-3816.

Anker, M., Stading, M., Hermansson, A.-M. (2001). Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 989-995.

ASTM (1993). E 96-93 – Standard test method for water vapour transmission of materials. En: *Annual Book of ASTM Standard*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 701-708.

ASTM (2000). D882 – Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. En: *Annual Book of ASTM Standard*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 160-168.

Avella, M., De Vlieger, J.J., Errico, M.E., Fischer, S., Vacca, P., Volpe, M.G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, 93, 467-474.

Aznar, M., Gomez-Estaca, J., Velez, D., Devesa, V., Nerin, C. (2013). Migrants determination and bioaccessibility study of ethyl lauroyl arginate (LAE) from a LAE based antimicrobial food packaging material. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 363-370.

Bae, H.J., Park, H.J., Hong, S.I., Byun, Y.J., Darby, D.O., Kimmel, R.M., Whiteside, W.S. (2009). Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1179-1186.

Baldwin, E.A. (1994). Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future. En *Edible coatings and films to improve food quality*. Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, pp.25-64.

Banerjee, R., Chen, H. (1995). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 78, 1673-1683.

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 1073-1101.

Beigzadeh Ghelejlou, S., Esmaili, M., Almasi, H. (2016). Characterization of chitosan–nanoclay bionanocomposite active films containing milk thistle extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 613-621.

Bertollini, A.C., Mestres, C., Colonna, P. (2000). Rheological properties of acidified and UV-irradiated starches. *Starch/Stärke*, 52, 340-344.

Byler, D.M., Susi, H. (1988). Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins. *Journal of Industrial Microbiology*, 3, 73-88.

Boesel, L.F. (2016) Effect of plasticizers on the barrier and mechanical properties of biomimetic composites of chitosan and clay. *Carbohydrate Polymers*, 115, 356–363.

Bonnaillie L.M., Tomasula, P.M. (2008), Whey protein fractionation. En *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Onwulata Ch. I., Huth. P. J. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp.15-38.

Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Cerqueira, M.A., Rocha, C.M.R., Avides, M.C., Quintas, M.A.C., Vicente, A.A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 116, 111-118.

Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawat, P., Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of select parameters on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technology*, 39, 406-419.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

Byler, D. M., Susi, H. (1988). Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins. *Journal of Industrial Microbiology*, 3, 73-88.

Cabello, P.S.D., Takara, E.A., Marchese, J., Ochoa, N.A. (2015). Influence of plasticizers in pectin films: microstructural changes. *Materials Chemistry and Physics*, 162, 491-497.

Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. (2004). Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Journal of Food Protection*, 67 (4), 833-848.

Campos, C.A., Gerschenson, L.N., Flores, S.K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875.

Castillo, M., Jordán, M.J., Abellán, A., Laencina, J., López, M.B. (1996). Tecnología de aprovechamiento del lactosuero. *Revista Española de Lechería*, marzo, 24-30.

Castro-Rosas, J., Cruz-Galvez, A., Gomez-Aldapa, C.A., Falfan-Cortes, R.N., Guzman-Ortiz, F.A., Rodríguez-Marín, M.L. (2016). Biopolymer films and the effects of added lipids, nanoparticles and antimicrobials on their mechanical and barrier properties: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 51, 1967-1978.

Cervato, G., Cazzola, R., Cestaro, B. (1999). Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 291-296.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides, and proteins. En: *Food Chemistry*. Fennema O.R. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pp. 245-369.

Chen, P., Zhang, L. (2006). Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules*, 7, 1700-1706.

CIE (1976). *Official recommendations of the International Commission on Illumination Colorimetry*. Publication CIE No. 15 (D-1.3.1). Commission International de l'Eclairage. Paris.

Ciesla, K., Salmieri, S., Lacroix, M. (2006). γ -Irradiation influence on the structure and properties of calcium caseinate-whey protein isolate based films. Part 1. Radiation effect on the structure of proteins gels and films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6374-6384.

Coltelli, M.B., Wild, F., Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lindner, M., Schmid, M., Weckel, V., Müller, K., Rodriguez, P., Staebler, A., Rodríguez-Turienzo, L., Lazzeri, A. (2016). State of the art in the development and properties of protein-based films and coatings and their applicability to cellulose based products: an extensive review. *Coatings* 6, 1; doi:10.3390/coatings6010001.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L., Guilbert, S. (1998). Packaging films based on myofibrillar proteins: Fabrication, properties and applications. *Nahrung/Food*. 42, 260-263.

Dangaran, K.L., Krochta, J.M. (2008). Whey protein films and coatings. En: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Onwulata, Ch.I., Huth, P.J. (Eds.), IFT Press Series. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 133-168.

Dangaran, K., Tomasula, P. M., Qi, P. (2009). Structure and function of protein based edible films and coatings. En *Edible films and coatings for food applications*, Embuscado, M.E., Huber K.C. (Eds.), Springer, Nueva York, pp. 25-56.

Davies, M.J., Truscott, R.J.W. (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63, 114-125.

Dean, K., Yu, L. (2005). Biodegradable protein-nanoparticle composites. En *Biodegradable polymers for industrial applications*, Smith, R. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 289-309.

de Azeredo, H.M.C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42 (9), 1240-1253.

de Azeredo, H.M.C. (2013). Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 30, 56-69.

Debeaufort, F. (2014). Hydrocolloids as edible or active packaging materials. En: *Gums and stabilisers for the food industry 17. The changing face of food manufacture: the role of hydrocolloids*. Williams P.A., Phillips G.O. (Eds.). The Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp. 271-286.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 299-313.

de la Caba, K., Peña, C., Ciannamea, E. M., Stefani, P. M., Mondragon, I., Ruseckaite, R. A. (2012). Characterization of soybean protein concentrated stearic acid/palmitic acid blend edible films. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, 1796-1807.

de la Fuente, M.A., Singh, H., Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 262-274.

Delville, J., Joly, C., Dole, P., Bliard, C. (2002). Solid state photocrosslinked starch based films: A new family of homogeneous modified starches. *Carbohydrate Polymers*, 49, 71-81.

Dhall, R.K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435-450.

Dias, M.V., Azevedo, V.M., Borges, S.V., Soares, N.F.F., Fernandes, R.V.B., Marques, J.J., Medeiros, E.A.A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated alpha-tocopherol. *Food Chemistry*, 165, 323-329.

Díaz, O., Candia, D., Cobos, A. (2016). Effects of ultraviolet radiation on properties of films from whey protein concentrate treated before or after film formation. *Food Hydrocolloids*, 55, 189-199.

Díaz Rubio, O., Cobos García, Á. (2004). Obtención y aplicación de concentrados de proteínas de suero lácteo en la industria alimentaria. En *Innovación y Desarrollo en la Industria Alimentaria. Facultad de Ciencias de Lugo. Cursos de Verán 2004*. Fraga López F., Martínez Ageitos J.M. (Eds.), Universidad de Santiago de Compostela. Facultade de Ciencias. Lugo, pp. 45-54.

Doultani, S., Turhan, K.N., Etzel, M.R. (2003). Whey protein isolate and glycomacropéptido recovery from whey using ion exchange chromatography. *Journal of Food Science*, 68, 1389-1395.

Du, H., Hu, Q., Yang, W., Pei, F., Kimatu, B.M., Ma, N., Fang, Y., Cao, C., Zhao, L. (2016). Development, physiochemical characterization and forming mechanism of *Flammulina velutipes* polysaccharide-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, 152, 214-221.

Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182.

Echeverría, I., Eisenberg, P., Mauri, A.N. (2014). Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 449, 15-26.

Eissa, A.S., Puhl, C., Kadla, J.F., Khan, S.A. (2006). Enzymatic cross-linking of β -lactoglobulin: conformational properties using FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7, 1707-1713.

Elias, R.J., McClements, D.J., Decker, E.A. (2005). Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10248-10253.

Elsabee, M.Z., Abdou, E.S. (2013) Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering C* 33, 1819-1841.

Falguera, V., Pagán, J., Garza, S., Garvín, A., Ibarz, A. (2011). Ultraviolet processing of liquid food: A review. Part 1: Fundamental engineering aspects. *Food Research International*, 44, 1571-1579.

Fiedorowicz, M., Tomasik, P., You, S., Lim, S.-T. (1999). Molecular distribution and pasting properties of UV-irradiated corn starches. *Starch/Stärke*, 51, 126-131.

Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M.K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 151-159.

Foegeding, E.A., Luck, P.J. (2003). Milk proteins: Whey protein products. En *Encyclopedia of dairy sciences*. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (Eds.), Academic Press (Elsevier Science). Londres. pp. 1957-1960.

Galus, S., Kadzinska, J. (2016). Whey protein edible films modified with almond walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86.

Ganiari S., Choulitoudi E., Oreopoulou V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science & Technology* 68, 70-82.

Gao, W., Dong, H., Hou, H., Zhang, H. (2012). Effects of clays with various hydrophilicities on properties of starch–clay nanocomposites by film blowing. *Carbohydrate Polymers*, 88, 321-328.

Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Weller, C.L., Testin, R.F. (1993b). Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1835-1839.

Gennadios, A., Rhim, J.W., Handa, A., Weller, C.L., Hanna, M. A. (1998). Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science*, 63, 225-228.

Gennadios, A., Weller, C.L., Testin, R.F. (1993a). Property modification of edible wheat, gluten-based films. *American Society of Agricultural Engineering*. 36(2), 465-470.

George, J., Siddaramaiah. (2012). High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2031-2037.

Ghanbarzadeh, B., Oromiehi, A.R. (2008). Studies on glass transition temperature of mono and bilayer protein films plasticized by glycerol and olive oil. *Journal of Applied Polymer Science*, 109, 2848-2854.

Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G., Koutsoumanis, K.P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402-2408.

Giannakas, A., Grigoriadi, K., Leontiou, A., Barkoula, N.M., Ladavos, A. (2014). Preparation, characterization, mechanical and barrier properties investigation of chitosan-clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 108, 103-111.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57 (1), 190–195.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.-L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58, 206–211.

Gounga, M. E., Xu, S.-Y., Wang, Z. (2007). Whey protein isolate-based edible as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 83, 521-530.

Graveland-Bikker, J.F., de Kruif, C.G. (2006), Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends in Food Science & Technology* 17, 196-203.

Greener Donhowe I., Fennema O. (1994). Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Krochta J.M., Balwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O. (Eds.). Technomic Publishing. Lancaster, pp. 1-24.

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.

Gómez-Estaca, J., Gavara, R., Catalá R., Hernandez-Muñoz P. (2016). The potential of proteins for producing food packaging materials: a review. *Packaging Technology and Science*, 29, 203-224.

Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. En: *Food packaging and preservation*. Mathlouthi M. (Ed.). Elsevier Applied Science. Londres, pp. 371-394.

Gulzar, M., Bouhallad, S., Jeantet, R., Schuck, P., Croguennec, T. (2011). Influence of pH on the dry heat-induced denaturation/aggregation of whey proteins. *Food Chemistry*, 129, 110-116.

Hardenberg, R.E., (1967). *Wax and related coatings for horticultural products-A bibliography*. Agricultural Research Service Bulletin No. 965, Cornell University Ithaca, NY.

Hernandez, E. (1994). Edible coatings from lipids and resins. En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Krochta J.M., Balwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O. (Eds.). Technomic Publishing. Lancaster, pp. 279-334.

Hernandez-Muñoz, P., Kanavouras, A., Lagaron, J.M., Gavara, R. (2005). Development and characterization of films based on chemically cross-linked gliadins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8216–8223.

Higueras, L., Lopez-Carballo, G., Hernandez-Munoz, P., Gavara, R., Rollini, M. (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N(alpha)-dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 339-345.

Hong, S.I., Krochta, J.M. (2006). Oxygen barrier performance of whey protein-coated plastic films as affected by temperature, relative

humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*, 77, 739-745.

Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K., Kubo, T. (1990). Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 29(5), 800-805.

Ibarz, A., Garvín, A., Falguera, V. (2015). Ultraviolet in food preservation and processing. En: *Conventional and advanced food processing technologies*, 1st ed., Battacharya S. (Ed.), John Wiley & Sons. Chichester, pp. 413-435.

Ishizaki, S., Hamada, M., Iso, N., Taguchi, T. (1993). Effect of ultraviolet irradiation on rheological properties of thermal gels from sardine and pork meat pastes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1219-1224.

Ishizaki, S., Ogasawara, M., Tanaka, M., Taguchi, T. (1994). Ultraviolet denaturation of flying fish myosin and its fragments. *Fisheries Science*, 60, 603-606.

Iwami, K., Hattori, M., Ibuki, F. (1987). Prominent antioxidant effect of wheat gliadine on linoleate peroxidation in powder model systems at higher water activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 628-631.

Jamròz, E., Kopel, P., Juszczak, L., Kawecka, A., Bytesnikova, Z., Milosavljevic, V., Kucharek, M., Makarewicz, M., Adam V. (2018). Development and characterisation of furcellaran-gelatin films containing SeNPs and AgNPs that have antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 83, 9-16.

Janjarasskul, T., Rauch, D.J., McCarthy, K.L., Krochta, J.M. (2014). Barrier and tensile properties of whey protein-candelilla wax film/sheet. *LWT- Food Science and Technology*, 56, 377-382.

Javanmard, M., Golestan, L. (2008). Effect of olive oil and glycerol on physical properties of whey protein concentrate films. *Journal of Food Process Engineering*, 31(5), 628-639.

Jelen, P. (2003). Whey processing: Utilization and products. En Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox P.F. (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, Academic Press (Elsevier Science). Londres, pp. 2739-2745.

Jiang, J., Xiong, Y.L., Newman, M.C., Rentfrow, G.K. (2012). Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. *Food Chemistry*, 132, 1944-1950.

Kamper, S.L., Fennema, O.N. (1984). Water vapor permeability of an edible fatty acid, bilayer films. *Journal of Food Science*, 49, 1482-1485.

Kasirga, Y., Oral, A., Caner, C. (2012). Preparation and Characterization of Chitosan/Montmorillonite-K10 Nanocomposites Films for Food Packaging Applications. *Polymer Composites*, 33, 1874-1882.

Kato, Y., Uchida, K., Kawakishi, S. (1992). Oxidative degradation of collagen and its model peptide by ultraviolet irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 373-379.

Kazmierski, M., Corredig, M. (2003). Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 17, 685-692.

Kehoe, J.J., Remondetto, G.E., Subirade, M., Morris, E.R., Brodtkorb, A. (2008). Tryptophan-mediated denaturation of β -lactoglobulin A by UV irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4720-4725.

Kester J.J., Fennema O.R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, 40(12), 47-59.

Khwalidia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 239-251.

Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.

Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 138-155.

Koutchma, T.N., Forney, L.J., Moraru, C.I. (2009). *Ultraviolet light in food technology. Principles and applications*. CRC Press – Taylor & Francis Group. Boca Raton.

Kowalczyk, D., Baraniak, B. (2014). Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films-A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 41, 195–209.

Kristo, E., Biliaderis, C.G. (2007). Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers*, 68, 146-158.

Kristo, W., Hazizaj, A., Corredig, M. (2012). Structural changes imposed on whey proteins by UV irradiation in a continuous UV light reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6204-6209.

Krochta, J.M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. En: *Protein-Based Films and Coatings*. Gennadios A. (Ed.) CRC Press. Boca Raton, pp. 1-41.

Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2), 61-74.

Kuan, Y.-H., Bhat, R., Patras, A., Karim, A.A. (2011). Emulsifying and foaming properties of ultraviolet-irradiated egg white protein and sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4111-4118.

Kuan, Y.-H., Bhat, R., Patras, A., Karim, A.A. (2013). Radiation processing of food proteins - A review on the recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 105-120.

Kumar, P., Sandeep, K.P., Alavi, S., Truong, V.D., Gorga, R.E. (2010). Effect of type and content of modified montmorillonite on the structure and properties of bio-nanocomposite films based on soy

protein isolate and montmorillonite. *Journal of Food Science*, 75, N46-N56.

Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., Buonocore, G.G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 291-298.

Lefèvre, T., Subirade, M., Pezolet, M. (2005). Molecular description of the formation and structure of plasticized globular protein films. *Biomacromolecules*, 6, 3209-3219.

Lin, K.F., Hsu, C.Y., Huang, T. S., Chiu, W.Y., Lee, Y.H., Young, T.H. (2005). A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 98(5), 2042-2047.

Liu, C.-C., Tellez-Garay, A.M., Castell-Perez, M.E. (2004). Physical and mechanical properties of peanut protein films. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37, 731-738.

Liu, P., Sun, S., Hou, H., Dong, H. (2016). Effects of fatty acids with different degree of unsaturation on properties of sweet potato starch-based films. *Food Hydrocolloids*, 61, 351–357.

López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerin, C. (2007). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8814-8824.

López de Lacey, A.M., López-Caballero, M.E., Gómez-Estaca J., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. (2012). Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16, 277-282.

López de Lacey, A.M., López-Caballero, M.E., Montero, P. (2014). Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 559-564

Loveday, S.M., Rao, M.A., Singh, H. (2012). Food protein nanoparticles: formation, properties and applications. En *Food*

Materials Science and Engineering. Bhandari, B., Roos, Y.H. (Eds.). Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 263-294.

Lu, W., Weng, L., Zhang, L. (2004). Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 5, 1046-1051.

Luecha, J., Sozer, N., Kokini, J.L. (2010). Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. *Journal of Materials Science*, 45, 3529-3557.

Majdzadeh-Ardakani, K., Navarchian, A.H., Sadeghi, F. (2010). Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 79, 547-554.

Mali, S., Grossmann, S., Ysamashita, F., Grossmann, M.V.E. (2005). Water sorption and mechanical properties cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 50, 283-289.

Manzocco, L. (2015). Photo-induced modification of food protein structure and functionality. *Food Engineering Reviews*, 7, 346-356.

Manzocco, L., Nicoli, M.C. (2015). Surface processing: existing and potential applications of ultraviolet light. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 469-484.

Martelli, M.R., Barros, T.T., de Moura, M.R., Mattoso, L.H.C., Assis, O.B.G. (2013). Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. *Journal of Food Science*, 78, N98-N104.

Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. (2009). Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings. En *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Huber, K.C., Embuscado M.E. (Eds.), Springer, Nueva York, pp. 295-313.

Martinez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodriguez-Felix, F., Castillo-Ortega, M.M., Burgos-Hernandez, A., Ezquerra-Brauer, J.M., Plascencia-Jatomea, M. (2013). Extruded films of blended chitosan, low density polyethylene and ethylene acrylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 91, 666-674.

Masutani, E.M., Kinoshita, C.K., Tanaka, T.T., Ellison, A.K.D., Yoza, B.A. (2014). Increasing thermal stability of gelatin by UV-induced cross-linking with glucose. *International Journal of Biomaterials*, 9. Article 979636.

Mauri, A.N., Añón, M.C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14(2), 119-125.

Mengatto, L.N., Helbling, I.M., Luna, J.A. (2012). Recent advances in chitosan films for controlled release of drugs. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, 6, 156-170.

Mercadé-Prieto, R., Gunasekaran, S. (2009). Alkali cold gelation of whey proteins. Part I: sol-gel-sol(-gel) transitions. *Langmuir*, 25, 5785-5792.

Micard, V., Belamri, R., Morel, M.-H., Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2948-2953.

Monahan, F.J., German, J.B., Kinsella, J.E. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulphide interchange reactions during heat induced gelation of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 46-52.

Müller, C.M.O., Laurindo, J.B., Yamashita, F. (2011). Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. *Industrial Crops and Products*, 33, 605-610.

Muñoz, L.A., Aguilera, J.M., Rodríguez-Turienzo L., Cobos, A., Diaz, O. (2012). Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 111, 511-518.

Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. (2014). Characterization of ethylene-vinyl alcohol copolymer containing lauril arginate (LAE) as material for active antimicrobial food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 10-18.

Muriel-Galet, V., Carballo, G.L., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. (2016). Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): usage and potential in antimicrobial packaging. En *Antimicrobial Food Packaging*. Barros-Velázquez, J. (Ed.), Elsevier Science Publishers, Barking, pp. 313-317.

Muscat, D., Tobin, M.J., Guo, Q., Adhikari, B. (2014). Understanding the distribution of natural wax in starch-wax films using synchrotron-based FTIR (S-FTIR). *Carbohydrate Polymers*, 102, 125-135.

Muzzarelli, R.A. (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Molecular Life Science*, 53(2), 131-140.

Nieto, M.B. (2009). Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. En *Edible Films and coatings for food applications*. Embuscado M.E., Huber K.C. (Eds.), Springer. Nueva York., pp. 57-112.

Osorio F.A., Molina P., Matiacevich S., Javier Enrione J., Skurtys O. (2011). Characteristics of hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) based edible film developed for blueberry coatings. *Procedia Food Science*, 1, 287-293.

Otoni, C.G., Avena-Bustillos, R.J., Chiou, B.-C., Bilbao-Sainz, C., Bechtel, P.J., McHugh, T.H. (2012). Ultraviolet-B radiation induced cross-linking improves physical properties of cold- and warm-water fish gelatin gels and films. *Journal of Food Science*, 77, E215-E223.

Palou, L., Valencia-Chamorro, S.A., Pérez-Gago, M.B. (2015). Antifungal Edible Coatings for Fresh Citrus Fruit: A Review. *Coatings* 2015, 5, 962-986.

Park, H-M., Li, X., Jin, C.-Z., Park, C.-Y., Cho, W-J., Ha, C.-S. (2002a). Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. *Macromolecular Materials and Engineering*, 287, 553-558.

Park, S.Y., Marsh, K.S., Rhim, J.W. (2002b). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvent. *Journal of Food Science*, 67(1), 194-197.

Park, S., Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933-1939.

Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11, 38-56.

Pavlath, A.E., Orts, W. 2009. Edible films and coatings: why, what, and how. En: *Edible Films and Coatings for Food Applications*, Embuscado M.E., Huber K.C. (Eds.), Springer Science and Business Media, LLC, Nueva York, pp. 1-23.

Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., Van Impe, F., Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 32, 128-141.

Pereira, R.N., Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2010). Effects of electric fields on protein unfolding and aggregation: influence on edible films formation. *Biomacromolecules*, 11, 2912-2918.

Pereira, R.C., Carneiro, J.D.S., Borges, S.V., Assis, O.B.G., Alvarenga, G.L. (2016). Preparation and characterization of nanocomposites from whey protein concentrate activated with lycopene. *Journal of Food Science*, 81, E637–E642

Pereira, R.C., Carneiro, J.D.S., Assis, O.B.G., Borges, S.V. (2017). Mechanical and structural characterization of whey protein concentrate/montmorillonite/lycopene films. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 97, 4978-4986.

Pérez, L.M., Piccirilli, G.N., Delorenzi, N.J., Verdini, R.A. (2016). Effect of different combinations of glycerol and/or trehalose

on physical and structural properties of whey protein concentrate-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 56, 352–359.

Pérez-Gago, M.B. (2012). Protein-based films and coatings. En *Edible coatings and films to improve food quality*. Baldwin E.A., Hagenmaier R., Bai J. (Eds.), CRC Press. Boca Raton, pp. 13-77.

Pérez-Gago, M.B., Krochta, J.M. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66, 705-710.

Pérez-Gago, M.B., Krochta, J.M. (2002). Formation and properties of whey protein films and coatings. En: *Protein-Based Films and Coatings*. Gennadios A. (Ed.), CRC Press. Boca Raton, pp. 159-180.

Pérez-Gago, M.B., Nadaud, P., Krochta, J.M. (1999). Water vapour permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64, 1034-1037.

Permyakov, E.A., Permyakov, S.E., Deikus, G.Y., Morozova-Roche, L.A., Grishchenko, V.M., Kalinichenko, L.P., Uversky, V.N. (2003). Ultraviolet illumination-induced reduction of α -lactalbumin disulfide bridges. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 51, 498-503.

Pezo, D., Navascues, B., Salafranca, J., Nerin, C. (2012). Analytical procedure for the determination of ethyl lauroyl arginate (LAE) to assess the kinetics and specific migration from a new antimicrobial active food packaging. *Analytica Chimica Acta*, 745, 92-98.

Phupoksakul, T., Leuangsukrerk, M., Somwangthanaroj, A., Tananuwong, K., Janjarasskul, T. (2017). Storage stability of packaged baby formula in poly(lactide)-whey protein isolate laminated pouch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3365-3373.

Pinotti, A., García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. (2007). Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 66-72.

Plackett, D., Siró, I. (2012). Nanocomposites for food and beverage packaging. En *Emerging food packaging technologies. Principles and practice*, Yam, K.L., Lee, D.S. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 239-273.

Praxedes, A.P.P., da Silva, A.J.C., da Silva, R.C., Lima, R.P.A., Tonholo, J., Ribeiro, A.S., Oliveira, I.N. (2012). Effects of UV irradiation on the wettability of chitosan films containing dansyl derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science*, 376, 255-261.

Qin, Y.-Y., Zhang, Z.-H., Li, L., Yuan, M.-L., Fan, J., Zhao, T.-R. (2015). Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1471-1479.

Quinn, G., Monahan, E.J., O'Riordan, E.D., O'Sullivan, M., Longares, A. (2003). Role of covalent and noncovalent interactions in the formation of films from unheated whey protein solutions following pH adjustment. *Journal of Food Science*, 68, 2284-2288.

Ramos, O.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 533-552.

Ramos, O.L., Reinas, I., Silva, S.I., Fernandes, J.C., Cerqueira, M.A., Pereira, R.N., Vicente, A.A., Poças, M.F., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30, 110-122.

Rhim, J.-W. (2011). Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 86, 691-699.

Rhim, J.-W. (2012). Physical-mechanical properties of agar/ κ -carrageenan blend film and derived clay nanocomposite film. *Journal of Food Science*, 77, N66-N73.

Rhim, J. W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C.L., Hanna, M.A. (1999). Properties of ultraviolet irradiated protein films. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 32, 129-133.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C.L., Hanna, M. A. (2000). Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4937-4941.

Rhim, J.W., Hong, S.I., Park, H.M., Ng, P.K.W. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5814-5822.

Rhim, J.W., Lee, J.H., Kwak, H.S. (2005). Mechanical and water barrier properties of soy protein and clay mineral composite films. *Food Science and Biotechnology*, 14, 112-116.

Rhim, J.-W., Ng, P.K.W. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 411-433.

Rhim, J.W., Shellhammer, T.H. (2005). Lipid-based edible films and coatings. En *Innovations in Food Packaging*, Han J.H. (Ed.), Academic Press, Londres, pp. 362–383.

Riddles, P.W., Blakeley, R.L., Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. *Methods in Enzymology*, 91, 49-60.

Riera, F.A., Álvarez, R., Argüello, M.A., Cabero, M. (1996). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo. I. Propiedades físico-químicas y biológicas de las proteínas. *ILE*, abril, 49-61.

Rocca-Smith, J.R., Marcuzzo, E., Karbowiak, T., Centa J., Giacometti M., Scapin, F., Venir, E., Sensidoni A., Debeaufort F. (2016). Effect of lipid incorporation on functional properties of wheat gluten based edible films. *Journal of Cereal Science*, 69, 275–282.

Rodrigues, D.C, Cunha, A.P., Brito, E.S., Azeredo, H.M.C., Gallao, M.I. (2016). Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: Influence of oil content and sonication. *Food Hydrocolloids*, 56, 227-235.

Rodríguez, F.J., Coloma, A., Galotto, M.J., Guarda, A., Bruna, J. (2012). Effect of organoclay content and molecular weight on cellulose acetate nanocomposites properties. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1996-2001.

Rodriguez-Turienzo, L., Cobos A., Díaz O. (2012). Effects of edible coatings based on ultrasound-treated whey proteins in quality attributes of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 92-98.

Rodriguez-Turienzo L., Cobos A., Moreno, V., Caride, A., Vieites, J.M., Díaz O. (2011). Whey protein-based coatings on frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*): Influence of the plasticizer and the moment of coating on quality preservation. *Food Chemistry*, 128, 187-194.

Romanazzi, G., Feliziani, E., Banos, S.B., Sivakumar, D. (2016). Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (3), 579-601.

Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I., Vieira, M.C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466-474.

Rubilar, J.F., Zúñiga, R.N., Osorio, F., Pedreschi, F. (2015). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose/whey protein isolate (HPMC/WPI) edible films. *Carbohydrate Polymers*, 123, 27-38.

Sanchez-Garcia, M.D., Hilliou, L., Lagaron, J.M. (2010). Morphology and water barrier properties of nanobiocomposites of k/ι-hybrid carrageenan and cellulose nanowhiskers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12847-12857.

Sanchez-Garcia, M.D., Lagaron, J.M. (2010). On the use of plant cellulose nanowhiskers to enhance the barrier properties of polylactic acid. *Cellulose*, 17, 987-1004.

Sanchez-Garcia, M.D., Lagaron, J.M. (2012). Nanocomposites for food and beverage packaging materials. En *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries*. Huang, Q. (Ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 335-361.

Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2010a). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277-283.

Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2010b). Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 443-452.

Sankri A., Arhaliass, A., Dez, I., Gaumont, A.C., Grohens, Y., Lourdin, D., Pillin, I., Rolland-Sabaté, A., Leroy, E. (2010). Thermoplastic starch plasticized by an ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*, 82, 256-263.

Sanmartín B., Díaz O., Rodríguez-Turienzo L., Cobos A. (2012). Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Research*, 105, 186-192.

Sanuja, S., Agalya, A., Umapathy, M.J. (2014). Studies on magnesium oxide reinforced chitosan bionanocomposite incorporated with clove oil for active food packaging application. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 63(14), 733-740.

Saremnezhad, S., Azizi, M.H., Barzegar, M., Abbasi, S., Ahmadi, E. (2011). Properties of a new edible film made of faba bean protein isolate. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 181-192.

Schmid, M., Held, J., Hammann, F., Schlemmer, D., Noller, K. (2015). Effect of UV-radiation on the packaging-related properties of

wey protein isolate based films and coatings. *Packaging Technology and Science*, 28, 883-899.

Schmid, M., Krimmel, B., Grupa, U., Noller, K. (2014a). Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of wey protein isolate-based films. *Journal of Dairy Science*, 97, 5315-5327.

Schmid, M., Prinz, T.K., Müller, K., Haas, A. (2017). UV radiation induced cross-linking of wey protein isolate-based films. *International Journal of Polymer Science*, vol. 2017, ID 1846031, 6 pages, <https://doi.org/10.1155/2017/1846031>.

Schmid, M., Sänglerlaub, S., Wege, L., Stäbler, A. (2014b). Properties of transglutaminase crosslinked wey protein isolate coatings and cast films. *Packaging Technology and Science*, 27, 799-817.

Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26, 246–265.

Sheldon, S.A., Jones, A.D., Shibamoto, T. (1988). Photochemical products of the cysteine/D-glucose browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 604-606.

Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M.A., Hosseini, H., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S.M., Haghshenas, M., Khaksar, R. (2014). Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with Zataria multiflora essential oil and nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 282-289.

Sionkowska, A., Kaczmarek, B., Gnatowska, M., Kowalonek, J. (2015). The influence of UV-irradiation on chitosan modified by the tannic acid addition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 333-339.

Sionkowska, A., Kaczmarek, H., Wisniewski, M., Skopinska, J., Lazare, S., Tokarev, V. (2006). The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface Science*, 600, 3775-3779.

Sionkowska, A., Planecka, A., Lewandowska, K., Kaczmarek, B., Szarszewska, P. (2013). Influence of UV-irradiation on molecular weight of chitosan. *Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 18(18), 21-28.

Slavustsky, A.M., Bertuzzi, M.A. (2016). Improvement of water barrier properties of starch films by lipid nanolamination. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 41–46.

Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6298-6302.

Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2005). Plasticizers in edible films and coatings. En: *Innovations in food packaging*, Han J.H. (Ed.), Elsevier, Londres, pp. 403-433.

Sothornvit, R., Rhim, J.W., Hong, S.I. (2009). Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. *Journal of Food Engineering*, 91, 468-473.

Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Casariego, A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2010). Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 330-335.

Sriupayo, J., Supaphol, P., Blackwell, J., Rujiravanit, R. (2005). Preparation and characterization of α -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment. *Carbohydrate Polymers*, 62, 130-136.

Stuart, B. (1997). *Biological applications of infrared spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester.

Svanborg, S., Johansen, A.G., Abrahamsen, R.K., Schuller, R.B., Skeie, S.B. (2016). Caseinomacropeptide influences the functional properties of a whey protein concentrate. *International Dairy Journal*, 60, 14-23.

Swain, S. K., Priyadarshini, P. P., Patra, S. K. (2012). Soy protein/clay bionanocomposites as ideal packaging materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 51(12), 1282-1287.

Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 23, 121-282.

Tang, X.Z., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K.P. (2012). Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 426-442.

Tavassoli-Kafrani, E., Hajar Shekarchizadeh, H., Masoudpour-Behabadi M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360-374.

Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 71-78.

Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987-6000.

Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1473-1478.

Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N., Gastaldi, E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 289, 159-168.

UE N° 432/2012. (2012). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.

Ustunol, Z., Mert, B. (2004). Water solubility, mechanical, barrier and thermal properties of cross-linked whey protein isolate-based films. *Journal of Food Science*, 69, 129-133.

Valdés A., Burgos N., Jiménez A., Garrigós M.C. (2015). Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. *Coatings*, 5, 865-886.

Valenzuela, C.V., Arias J.I. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias* 27 (1), 33-47.

Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536-547.

Vanhooren, A., Devreese, B., Vanhee, K., Van Beeumen, J., Hanssens, I. (2002). Photoexcitation of tryptophan groups induces reduction of two disulfide bonds in goat α -lactalbumin. *Biochemistry*, 41, 11035-11043.

Vejdani, A., Ojagh, S.M., Adeli, A., Abdollahi, M. (2016). Effect of TiO₂ nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. *LWT- Food Science and Technology*, 71, 88-95.

Venugopal, V. (2011). *Marine polysaccharides; food applications*. CRC Press. Boca Raton.

Vlacha, M., Giannakas, A., Katapodis, P., Stamatis, H., Ladavos A., Barkoula N.-M. (2016). On the efficiency of oleic acid as plasticizer of chitosan/clay nanocomposites and its role on thermo-mechanical, barrier and antimicrobial properties - Comparison with glycerol. *Food Hydrocolloids*, 57, 10-19.

Wang, H.-S., Chen, D., Chuai, C.-Z. (2015). Mechanical and barrier properties of LLDPE/chitosan blown films for packaging. *Packaging Technology Science* 28, 915-923.

Wang, J.Y., Fujimoto, K., Miyazawa, T., Endo, Y. (1991). Antioxidative mechanisms of maize zein in powder model systems against methyl linoleate: effect of water activity and coexistence of

antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 351-355.

Wang, H., Qian J., Ding F. (2018). Emerging chitosan-based films for food packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 395-413.

Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D.J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71, R107-R116.

Whitaker, J.R., Feeney, R.E. (1983). Chemical and physical modification of proteins by the hydroxide ion. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 19, 173-212.

Whitney, R. McL. (1999). Proteins in milk. En *Fundamentals of dairy chemistry* (3rd ed.). Wong N. P. (Ed.), Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, pp. 81-107.

Wihodo, M., Moraru, C.I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *Journal of Food Engineering*, 114, 292-302.

Williams, P.A., Phillips, G.O. (2009). Introduction to food hydrocolloids. En *Handbook of hydrocolloids*. Williams P.A., Phillips, G.O. (Eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Limited. Cambridge, pp. 1-22.

Wondraczek, H., Kotiaho, A., Fardim, P., Heinze, T. (2011). Photoactive polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1048-1061.

Xie, J., Qin, M., Cao, Y., Wang, W. (2011). Mechanistic insight of photo-induced aggregation of chicken egg white lysozyme: the interplay between hydrophobic interactions and formation of intermolecular disulfide bonds. *Proteins*, 79, 2505-2516.

Xiong, H.G., Tang, S.W., Tang, H.L., Zou, P. (2008). The structure and properties of a starch-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymers*, 71, 263-268.

- Xu, Y., Ren, X., Hanna, M.A. (2006). Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 99(4), 1684-1691.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H., Mau, J.-L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 840-844.
- Yildirim, M., Hettiarachchy, N. S. (1998). Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11s globulin using transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63, 248-252.
- Yu, J.H., Cui, G.J., Wei, M., Huang, J. (2007). Facile exfoliation of rectorite nanoplatelets in soy protein matrix and reinforced bionanocomposites thereof. *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 3367-3377.
- Zall, R.R. (1992). Sources and composition of whey and permeate. En *Whey and lactose processing*, J.G. Zadow (Ed.), Elsevier Science Publishers, Barking, pp. 1-72.
- Zeng, J.B., He, Y.S., Li, S.L., Wang, Y.Z. (2012). Chitin Whiskers: An Overview. *Biomacromolecules*, 13, 1-11.
- Zhang, C., Ding, Y. A., Ping, Q., Yu, L. (2006). Novel chitosan-derived nanomaterials and their micelle-forming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8409-8416.
- Zhang, P., Zhao L., Shi Q. (2016). Characterization of a novel edible film based on gum ghatti: Effect of plasticizer type and concentration. *Carbohydrate Polymers*, 153, 345-355.
- Zhao, R., Torley, P., Halley, P.J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Material Science*, 43, 3058-3071.
- Zheng, J.P., Li, P., Ma, Y.L., Yao, K.D. (2002). Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 1189-1194.

Zhou, J., Ma, Y. H., Zhang, J., Tong, J. (2009). Influence of surface photocrosslinking on properties of thermoplastic starch sheets. *Journal of Applied Polymer Science*, 112, 99–106.

Zink, J., Wyrobnik, T., Prinz, T., Schmid, M. (2016). Physical, chemical and biochemical modifications of protein-based films and coatings: an extensive review. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1376; doi:10.3390/ijms17091376.

Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A.E. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), M45-M51.

